



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C07K 19/00, 14/535, 14/52, C12N 15/62, A61K 38/19 // C12P 21/02, C12N 5/10	A1	(11) 国際公開番号 WO96/34016 (43) 国際公開日 1996年10月31日(31.10.96)
(21) 国際出願番号 PCT/JP96/01157 (22) 国際出願日 1996年4月26日(26.04.96) (30) 優先権データ 特願平7/102625 1995年4月26日(26.04.95) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 協和 醗酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)[JP/JP] 〒100 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 横井治彦(YOKOI, Haruhiko)[JP/JP] 〒305 茨城県つくば市千現1-23-5 Ibaraki, (JP) 塩津行正(SHIOTSU, Yukimasa)[JP/JP] 〒157 東京都世田谷区砧1-17-20 Tokyo, (JP) 小西のぼる(KONISHI, Noboru)[JP/JP] 〒747 山口県防府市新田535-12 Yamaguchi, (JP) 穴澤秀治(ANAZAWA, Hideharu)[JP/JP] 〒178 東京都練馬区南大泉4-19-18 Tokyo, (JP) 玉沖達也(TAMAOKI, Tatsuya)[JP/JP] 〒194 東京都町田市本町田2662-13 Tokyo, (JP)		山崎基生(YAMASAKI, Motoo)[JP/JP] 〒194 東京都町田市中町3-9-13 Tokyo, (JP) 寺崎容子(TERASAKI, Yoko)[JP/JP] 〒194 東京都町田市本町田1392-5 Tokyo, (JP) 内田和久(UCHIDA, Kazuhisa)[JP/JP] 〒194 東京都町田市成瀬2-12-3 Tokyo, (JP) 山下錦也(YAMASHITA, Kinya)[JP/JP] 〒411 静岡県三島市笹原新田25-2 Shizuoka, (JP) (81) 指定国 AU, CA, JP, KR, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title : NOVEL POLYPEPTIDES (54) 発明の名称 新規ポリペプチド (57) Abstract A fused polypeptide composed of a polypeptide having the G-CSF activity with another polypeptide having the TPO activity; a DNA encoding this fused polypeptide; a fused polypeptide wherein a polypeptide having the G-CSF activity has been fused with another polypeptide having the TPO activity via a spacer peptide; a DNA encoding this fused polypeptide; a polypeptide wherein the above-mentioned fused polypeptide composed of the polypeptide having the G-CSF activity with the polypeptide having the TPO activity has been further chemically modified with a polyalkylene glycol derivative; and a remedy for anemia containing such a fused polypeptide as the active ingredient.		

(57) 要約

本発明は、G-C S F活性を有するポリペプチドとT P O活性を有するポリペプチドとからなる融合ポリペプチドおよび該融合ポリペプチドをコードするDNA、スパーサーペプチドを介して、G-C S F活性を有するポリペプチドとT P O活性を有するポリペプチドとが融合した融合ポリペプチドおよび該融合ポリペプチドをコードするDNA、および、該G-C S F活性を有するポリペプチドとT P O活性を有するポリペプチドとからなる融合ポリペプチドがポリアルキレングリコール誘導体で化学修飾されたポリペプチドに関する。更に、該融合ポリペプチドを有効成分として含有してなる貧血治療剤に関する。

情報としての用途のみ

P C Tに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にP C T加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	PT	ポルトガル
AU	オーストラリア	EE	エストニア	LR	レソト	RU	ロシア連邦
AZ	アゼルバイジャン	ES	スペイン	LS	レソト	SE	スウェーデン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SG	シンガポール
BB	バハマ	FR	フランス	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア
BE	ベルギー	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロバキア
BG	ブルガリア	GE	グルジア	MD	モルドバ共和国	SN	セネガル
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MG	モザンビーク共和国	SZ	スワジランド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	MK	マケドニア共和国	TD	チャド
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	ML	マリ	TG	トーゴ
CA	カナダ	IL	イスラエル	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CC	中東	IS	イスラエル	MR	モリタニア	TR	トルコ
CG	コンゴ	IT	イタリア	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	JP	日本	MX	メキシコ	TA	タニ
CN	中国	KE	ケニア	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CU	キューバ	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NL	オランダ	US	アメリカ合衆国
CZ	チェコ共和国	KR	大韓民国	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン
		KZ	カザフスタン	NZ	ニュージーランド	VN	ベトナム

明 細 書

新 規 ポ リ ペ プ チ ド

技術分野

本発明は、顆粒球コロニー刺激因子（以下、G-C S Fと略記する）活性を有するポリペプチドと血小板増幅因子（トロンボポエチン；以下、T P Oと略記する）活性を有するポリペプチドとからなる融合ポリペプチドおよび該融合ポリペプチドをコードするDNAに関する。本発明の融合ポリペプチドは、血小板と好中球とを同時に生成・増幅させることができ、貧血の治療等に有用である。

背景技術

血液は赤血球、白血球、血小板といった造血細胞から構成される。これらの造血細胞はただ一種類の多分化能性血液幹細胞から種々の分化段階を経て、成熟する。その過程は、サイトカインと総称される一群の蛋白質因子により複雑な制御を受けている。ある一つのサイトカインは、種々の造血細胞の分化・増殖に関与する。一方、ある一つの造血細胞は、種々のサイトカインにより分化・増殖の制御を受ける。これをサイトカイン作用の重複と呼ぶ。これらのサイトカインのなかで、T P OとG-C S Fは作用の重複が少ないと考えられている。

T P Oは、主として血小板の形成に関与する。血小板は、主として骨髓中に存在する巨核球という大きな核を有する造血細胞の断片化により生成される。血小板は血管内の損傷部位において、血餅を生じさせるのに必須である。さらに、血小板は損傷部位において他の機能を持つ蛋白質を放出することで、血液凝固のみならず、損傷治癒において重要な働きを担う。血小板が減少すると出血し易い状態となり、致命的である。

G-C S Fは、白血球の一種である好中球の活性化ならびに好中球の前駆細胞からの分化を促進するサイトカインである。好中球は、外敵たとえば細菌やウイルスが侵入した際に、最初に防御反応をつかさどる。好中球が減少すると、感染

に対して無防備となり、この場合もしばしば致命的である。

現在の癌治療において、化学療法剤の投与やX線照射あるいは白血病治療における骨髓移植療法により、多分化能性血液幹細胞が損傷を受け、その結果、造血細胞が全て減少するという副作用が問題になっている。明らかに、血小板ならびに白血球減少の患者に対して、サイトカインを投与してそれらの細胞数を増幅させることは、出血傾向の改善や感染症の予防といった面で、非常に有益である。

血小板と好中球とを同時に増幅させるサイトカインは、現在までに見いだされておらず、そのような薬効をもった医薬品はない。

血小板の増幅または巨核球の分化増殖促進作用を有する物質としては、白血病阻害因子、幹細胞因子、マクロファージコロニー刺激因子、顆粒球／マクロファージコロニー刺激因子、エリスロポエチン、インターロイキン（IL）-3、IL-6、IL-11、巨核球コロニー刺激因子等が知られている〔メトカフ(Metcalf)ら, ブラッド(Blood) 80, 50-56 (1990); ハント(Hunt)ら, ブラッド(Blood) 80, 904-911 (1992); 特公平6-11705; ホフマン(Hoffman)ら, ブラッド・セル(Blood Cells) 13, 75-86 (1987); マツア(Mazur)ら, エクスペリメンタル・ヘマトロジー(Exp.Hematol.) 15, 1123-1133 (1987); マクニース(McNiece)ら, エクスペリメンタル・ヘマトロジー(Exp.Hematol.) 16, 807-810 (1988); ル(Lu)ら, プリティッシュ・ジャーナル・オブ・ヘマトロジー(Brit.J.Hematol.) 70, 149-156 (1988); イシバシ(Ishibashi)ら, プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc.Natl.Acad.Sci.USA) 86, 5953-5957 (1989), W095/21919, W095/18858〕。これら多くのサイトカインは、作用の重複によって、血小板を増幅させるものであると理解される。最近になって、c-mpl という受容体のリガンドが血小板増幅因子の中で、最も活性が強く、また直接作用するサイトカインであることが明らかにされた〔デサベイジ(de Sauvage)ら, ネイチャー(Nature) 369, 533 (1994)]。

顆粒球を増殖させる物質としては、前述のIL-3、マクロファージコロニー

刺激因子、顆粒球／マクロファージコロニー刺激因子等が知られているが、好中球を特異的に増殖させるという点でG-CSFが最も高い活性を有する〔ニコラ(Nicola)ら、ジャーナル・オブ・バイオロジカルケミストリー(J. Biol. Chem.) 258, 9017 (1983)〕。異なる二つのサイトカインを融合したポリペプチドとしては、特表平6-500116、米国特許第5359035号、エクスペリメンタル・ヘマトロジー(Exp. Hematol.) 21, 647-655 (1993)、同18, 615 (1990)等に報告がある。しかしながら、TPOが一方のサイトカインとして用いられた融合ポリペプチドは知られていない。

本発明の目的は、血小板と好中球とを同時に生成・増幅させることができる融合ポリペプチドを提供することにある。当該融合ポリペプチドが得られれば、巨核球コロニー形成ならびに好中球コロニー形成、巨核球前駆体および好中球前駆体の分化または成熟を制御することができる。

発明の開示

本発明は、G-CSF活性を有するポリペプチドとTPO活性を有するポリペプチドとからなる融合ポリペプチドおよび該融合ポリペプチドをコードするDNA、スパーサーペプチドを介して、G-CSF活性を有するポリペプチドとTPO活性を有するポリペプチドとが融合した融合ポリペプチドおよび該融合ポリペプチドをコードするDNA、および、該G-CSF活性を有するポリペプチドとTPO活性を有するポリペプチドとからなる融合ポリペプチドがポリエチレングリコール誘導体で化学修飾されたポリペプチドに関する。更に、該融合ポリペプチドを有効成分として含有してなる貧血治療剤に関する。

本発明で用いられるG-CSF活性を有するポリペプチドとしては、G-CSF活性を有する蛋白質であればいずれでもよく、例えば、第1表に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド〔ネイチャー(Nature) 319, 415 (1986)〕をあげることができる。

更に、第1表に示されたアミノ酸配列とは1個以上のアミノ酸が置換、欠失または付加したアミノ酸配列を有し、かつG-C S F活性を有する蛋白質をあげることができ、例えば、第2表、特開昭63-267299、特開昭63-299、特表昭63-500636等に記載のh G-C S Fをあげることができる。

第 1 表

X	Thr	Pro	Leu	Gly	Pro	Ala	Ser	Ser	Leu	Pro	Gln	Ser	Phe	Leu	Leu
1					5					10				15	
Lys	Cys	Leu	Glu	Gln	Val	Arg	Lys	Ile	Gln	Gly	Asp	Gly	Ala	Ala	Leu
		20						25					30		
Gln	Glu	Lys	Leu	Cys	Ala	Thr	Tyr	Lys	Leu	Cys	His	Pro	Glu	Glu	Leu
		35					40					45			
Val	Leu	Leu	Gly	His	Ser	Leu	Gly	Ile	Pro	Trp	Ala	Pro	Leu	Ser	Ser
	50					55				60					
Cys	Pro	Ser	Gln	Ala	Leu	Gln	Leu	Ala	Gly	Cys	Leu	Ser	Gln	Leu	His
	65				70				75						
Ser	Gly	Leu	Phe	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Leu	Gln	Ala	Leu	Glu	Gly	Ile
80				85				90					95		
Ser	Pro	Glu	Leu	Gly	Pro	Thr	Leu	Asp	Thr	Leu	Gln	Leu	Asp	Val	Ala
		100					105					110			
Asp	Phe	Ala	Thr	Thr	Ile	Trp	Gln	Gln	Met	Glu	Glu	Leu	Gly	Met	Ala
	115						120					125			
Pro	Ala	Leu	Gln	Pro	Thr	Gln	Gly	Ala	Met	Pro	Ala	Phe	Ala	Ser	Ala
	130					135					140				
Phe	Gln	Arg	Arg	Ala	Gly	Gly	Val	Leu	Val	Ala	Ser	His	Leu	Gln	Ser
	145				150				155						
Phe	Leu	Glu	Val	Ser	Tyr	Arg	Val	Leu	Arg	His	Leu	Ala	Gln	Pro	
160				165				170				174			

(X は H または Met を表す。)

第 2 表

N末アミノ酸の 位置(表1配 載のhG-CSF)	各種hG-CSF誘導体における置換アミノ酸											
	a)	b)	c)	d)	e)	f)	g)	h)	i)	j)	k)	l)
1番目(Thr)	*	Val	Cys	Tyr	Arg	*	Asn	Ile	Ser	*	Ala	*
3番目(Leu)	Glu	Ile	Ile	Ile	Thr	Thr	Glu	Thr	Thr	*	Thr	*
4番目(Gly)	Lys	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Tyr	*
5番目(Pro)	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	*	Arg	*
17番目(Cys)	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser

* : 置換されていないアミノ酸

本発明で用いられるTPO活性を有するポリペプチドとしては、TPO活性を有する蛋白質であればいずれでもよく、例えば、第3表に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドであるc-mplリガンド〔ネイチャー(Nature) 369, 533 (1994)〕の他、白血病阻害因子、幹細胞因子、マクロファージコロニー刺激因子、顆粒球/マクロファージコロニー刺激因子、エリスロポエチン、インターロイキン(IL)-3、IL-6、IL-11、巨核球コロニー刺激因子等をあげることができる。

第 3 表

SerProAlaProProAlaCysAspLeuArgValLeuSerLysLeu	1	5	10	15
LeuArgAspSerHisValLeuHisSerArgLeuSerGlnCysPro	20	25	30	
GluValHisProLeuProThrProValLeuLeuProAlaValAsp	35	40	45	
PheSerLeuGlyGluTrpLysThrGlnMetGluGluThrLysAla	50	55	60	
GlnAspIleLeuGlyAlaValThrLeuLeuLeuGluGlyValMet	65	70	75	
AlaAlaArgGlyGlnLeuGlyProThrCysLeuSerSerLeuLeu	80	85	90	
GlyGlnLeuSerGlyGlnValArgLeuLeuLeuGlyAlaLeuGln	95	100	105	
SerLeuLeuGlyThrGlnLeuProProGlnGlyArgThrThrAla	110	115	120	
HisLysAspProAsnAlaIlePheLeuSerPheGlnHisLeuLeu	125	130	135	
ArgGlyLysValArgPheLeuMetLeuValGlyGlySerThrLeu	140	145	150	
CysValArgArgAlaProProThrThrAlaValProSerArgThr	155	160	165	
SerLeuValLeuThrLeuAsnGluLeuProAsnArgThrSerGly	170	175	180	
LeuLeuGluThrAsnPheThrAlaSerAlaArgThrThrGlySer	185	190	195	
GlyLeuLeuLysTrpGlnGlnGlyPheArgAlaLysIleProGly	200	205	210	
LeuLeuAsnGlnThrSerArgSerLeuAspGlnIleProGlyTyr	215	220	225	
LeuAsnArgIleHisGluLeuLeuAsnGlyThrArgGlyLeuPhe	230	235	240	
ProGlyProSerArgArgThrLeuGlyAlaProAspIleSerSer	245	250	255	
GlyThrSerAspThrGlySerLeuProProAsnLeuGlnProGly	260	265	270	
TyrSerProSerProThrHisProProThrGlyGlnTyrThrLeu	275	280	285	
PheProLeuProProThrLeuProThrProValValGlnLeuHis	290	295	300	
ProLeuLeuProAspProSerAlaProThrProThrProThrSer	305	310	315	
ProLeuLeuAsnThrSerTyrThrHisSerGlnAsnLeuSerGln	320	325	330	
GluGly	332			

本発明のポリペプチドを構成するG-C-S-F活性を有するポリペプチドおよびT-P-O活性を有するポリペプチドは、それぞれ、活性に関与する部分が含まれるポリペプチドであればよい。例えば、T-P-O活性を有するポリペプチドとしてc-m-p-lリガンドを用いる場合、N末端アミノ酸から153～154番目のアミノ酸配列が含まれていればよい。

また、本発明のポリペプチドは、スペーサーペプチドを介してG-C-S-F活性を有するポリペプチドとT-P-O活性を有するポリペプチドとを融合させたポリペプチドを含む。当該スペーサーペプチドとしては、G-C-S-F活性およびT-P-O活性を妨げないものなら、いかなる配列でも用いることができる。例えば、第4表に挙げられたペプチド等をスペーサーペプチドとして用いることができる。

第 4 表

リンカー
(GlyGlyGlySer) ₃ Arg
(SerGlyGlyGly) ₄ Arg
SerGlyGlyGlyArg
(SerGlyGlyGly) ₄
SerGlyGlyGly
(GlyGlyGlySer) ₃
(GlyGlyGlySer) ₂

本発明の融合ポリペプチドの具体例としては、配列番号1、2または3に示したアミノ酸配列を有するポリペプチド等および該融合ポリペプチドのアミノ酸配列において、G-C-S-F活性およびT-P-O活性を失わない範囲で、1個以上のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されたポリペプチドで、該ポリペプチドのアミノ酸配列と40%以上の相同性を有するものをあげることができる。相同性は、60%以上が好ましく、更に好ましくは80%以上である。

ここで、アミノ酸の置換、欠失または付加は、ヌクレイック・アシッド・リサ

ーチ (Nucleic Acid Research), 10, 6487 (1982)、プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci., USA), 79, 6409 (1982)、プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci., USA), 81, 5662 (1984)、サイエンス (Science), 224, 1431 (1984)、PCT W085/00817、ネイチャー (Nature), 316, 601 (1985)、ジーン (Gene), 34, 315 (1985)、ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 13, 4431 (1985)、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー (Current Protocols in Molecular Biology), 8章 Mutagenesis of Cloned DNA, John Wiley & Sons, Inc. (1989)等に記載の方法に準じて実施することができる。

また、上記ポリペプチドのN末端アミノ酸に分泌シグナルペプチドの付加したアミノ酸配列を有するペプチドも本発明の融合ポリペプチドに含まれ、例えば、配列番号4、5または6に示したアミノ酸配列を有するポリペプチド等をあげることができる。

更に、上記ポリペプチドの少なくとも1個のアミノ基がポリアルキレングリコール誘導体で化学修飾されたG-C S F活性およびT P O活性を有する融合ポリペプチドも本発明の融合ポリペプチドに含まれる。

ポリアルキレン誘導体としては、ポリエチレングリコール誘導体、ポリプロピレングリコール誘導体、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体等の誘導体をあげることができ、例えば、ポリエチレングリコール-サクシンイミジル プロピオネイトをあげることができる。

該ポリエチレングリコール誘導体で化学修飾された融合ポリペプチドは、特公平7-96558に記載された方法により作製することができる。

本発明の融合ポリペプチド（以下、T P O-C S Fと略す）をコードするDNAは、公知のT P O活性を有するポリペプチドの塩基配列およびG-C S F活性を有するポリペプチドの塩基配列をもとにして、ポリメラーゼ・チェーン・リア

クション（PCR）法等により得ることができる。また、化学合成により取得することもできる。

TPO-CSFをコードするDNAとしては、配列番号1、2または3に示したアミノ酸配列を有するポリペプチド、あるいは、配列番号1、2または3に示したアミノ酸配列とは1個以上のアミノ酸が置換、欠失または付加したアミノ酸配列を有し、かつG-CSF活性およびTPO活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNAをあげることができ、例えば、配列番号4、5または6に示した塩基配列を含むDNAをあげることができる。

更に、上記DNAに対して、G-CSF活性およびTPO活性を失わない範囲内で置換変異、欠失変異、挿入変異などの変異が導入されたDNAをあげることができ、例えば、配列番号4、5または6に示した塩基配列を含むDNAをプローブとして、コロニーハイブリダイゼーション法またはブラークハイブリダイゼーション法を用いることにより得られるDNAをあげることができる。

具体的には、コロニーあるいはブラーク由来のDNAを固定化したメンブランフィルターを用いて、0.7～1.0M塩化ナトリウム存在下、65℃で、配列番号4、5または6に示した塩基配列を含むDNAをプローブとして、ハイブリダイゼーションを行った後、0.1倍濃度から2倍濃度までの間の濃度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸3ナトリウムである。）中、65℃でフィルターを洗浄することにより同定されるDNAをあげることができる。

なお、ハイブリダイゼーションの実験法は、モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル（Molecular Cloning, A laboratory manual）、第2版〔サンプルック（Sambrook）、フリッチ（Fritsch）、マニアチス（Maniatis）編集、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス（Cold Spring Harbor Laboratory Press）、1989年刊〕に記載されている。

TPO-CSFは上記で定義されるDNAによってコードされる全てのポリペ

プチドを包含する。

TPO-CSFをコードするDNAを含むプラスミドとしては、例えば、pBS-T153LND28、pBS-T154ND28、pBS-153ND28LN1が挙げられる。pBS-T153LND28を含む大腸菌であるEscherichia coli TLN-1、pBS-T154ND28を含む大腸菌であるEscherichia coli TN-1 は、平成7年2月16日付で工業技術院生命工学工業技術研究所、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305）にそれぞれFERM BP-5001、FERM BP-5002として寄託されている。

上記のようにして得られるTPO-CSFをコードする遺伝子（以下、TPO-CSF遺伝子と略す）を宿主中で発現させるためには、まず、TPO-CSF遺伝子を含むDNA断片を、制限酵素類あるいはDNA分解酵素類で、TPO-CSF遺伝子を含む適当な長さのDNA断片とした後に、発現ベクター中プロモーターの下流に挿入し、次いで上記DNAを挿入した発現ベクターを、発現ベクターに適合した宿主中に導入する。

宿主としては、目的とする遺伝子を発現できるものは全て用いることができる。例えば、エッシェリヒア属、セラチア属、コリネバクテリウム属、プレバクテリウム属、シュドモナス属、バチルス属、等に属する微生物菌株の他、酵母菌株や動物細胞宿主等をあげることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主において自立複製可能ないしは染色体中への組込みが可能で、TPO-CSF遺伝子を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

大腸菌等の微生物を宿主として用いる場合は、TPO-CSF発現ベクターは微生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、TPO-CSF遺伝子、転写終結配列、より構成されていることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2（いずれもベーリンガーマンハイム社より市販）、pKYP10（特開昭58-1106

00)、pKYP200〔アグリカルチャラル・バイオロジカル・ケミストリー(Agric. Biol. Chem.), 48, 669 (1984)〕、pLSA1〔アグリカルチャラル・バイオロジカル・ケミストリー(Agric. Biol. Chem.), 53, 277 (1989)〕、pGEL1〔プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci., USA), 82, 4306 (1985)〕、pBluescript (STRATAGENE社)、pTrs30〔エシェリヒア・コリ JM109/pTrS30 (FERM BP-5407) より調製〕、pTrs32〔エシェリヒア・コリ JM109/pTrS32 (FERM BP-5408) より調製〕、pAGE107〔特開平3-22979; Miyajiら, サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133(1990)〕、pAS3-3〔特開平2-227075〕およびpAMoERC3Sc CDM8〔ブライアン・シード(Brian Seed)ら, ネイチャー(Nature), 329, 840(1987)〕等を例示することができる。

プロモーターとしては、大腸菌等の宿主中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター(P_{trp})、lacプロモーター(P_{lac})、P_Lプロモーター、P_Rプロモーターなどの、大腸菌やファージ等に由来するプロモーターをあげることができる。またP_{trp}を2つ直列させたプロモーター(P_{trp}×2)、lacプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

リボソーム結合配列としては、大腸菌等の宿主中で発現できるものであればいかなるものでもよいが、リボソーム結合配列と開始コドンとの間を適当な距離(例えば6~18塩基)に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

TPO-CSF遺伝子はTPO-CSFをコードする遺伝子であればいずれも用いることができるが、該遺伝子のDNA配列を宿主微生物での発現に最適なコドンとなるように、塩基を置換して用いることが好ましい。

本遺伝子の発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、好適には構造遺伝子直下に転写終結配列を配置することが望ましい。

宿主としては、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli DH5 α 、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Brevibacterium flavum ATCC14067、Brevibacterium lactofermentum ATCC13869、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium acetoxidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354等をあげることができる。

酵母菌株を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEp 13 (ATCC37115)、YEp 24 (ATCC37051)、YCP 50 (ATCC37419)等を例示することができる。

プロモーターとしては、酵母菌株の宿主中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、ヘキソースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF α 1プロモーター、CUP 1プロモーター等のプロモーターをあげることができる。

宿主としては、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius等をあげることができる。

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、p cDNA 1/Amp、p cDNA 1、p cDM 8 (いずれもフナコシ社より市販) p cDNA 3 (インヴィトロジェン社製)、pAGE 248、pAGE 210等を例示することができる。

プロモーターとしては、動物細胞の宿主中で発現できるものであればいかなる

ものでもよい。例えば、ヒトCMVのIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター等のプロモーターをあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

TPO-CSF遺伝子はTPO-CSFをコードする遺伝子であればいずれも用いることができる。

通常、該遺伝子から発現されたTPO-CSFは、発現された一部しか細胞外に分泌されないため、積極的にTPO-CSFを宿主細胞外に分泌させるには、ポールソンらの方法〔C. Paulsonら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 264, 17619 (1989)〕およびロウらの方法〔John. B. Lowe ら、プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.), USA, 86, 8227 (1989)、John. B. Lowe ら：ジーンズ・アンド・ディベラプメント (Genes Develop.), 4, 1288 (1990)〕に準じて、該遺伝子にシグナルペプチドをコードする塩基配列を付加した配列を有する遺伝子を作製し、該遺伝子を用いるとよい。

宿主としては、ナマルバ細胞、HB T 5 6 3 7 (特開昭63-299)、COS細胞、CHO細胞等をあげることができる。

動物細胞へのTPO-CSF遺伝子を含むDNAの導入法としては、動物細胞にDNAを導入することができればいかなる方法も用いることができる。例えば、エレクトロポレーション法〔Miyajiら：サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)〕、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法〔フィリップ・エル・フェルグナー (Philip L. Felgner)ら：プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci., USA), 84, 7413 (1987)〕等を用いることができる。形質転換株の取得および培養は、特開平2-227075あるいは特開平2-257891に記載されている方法に準じて行なうことができる。

上記のようにして得られた形質転換体を通常の培養方法に従って培養すること

により、T P O - C S Fを生産させることができる。

大腸菌や酵母菌等の微生物を宿主として用いた形質転換体を培養する培地は、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。

炭素源としては、それぞれの微生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類が用いられる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、りん酸アンモニウム、等の各種無機酸や有機酸のアンモニウム塩、その他含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等が用いられる。

無機物としては、りん酸第一カリウム、りん酸第二カリウム、りん酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等が用いられる。

培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16～96時間である。培養中pHは、3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

また培養中に必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG)

等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸 (IAA) 等を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主として用いた形質転換体を培養する培地は、一般に使用されているRPMI 1640培地、MEM培地〔イーグル(Eagle)社製、ギブコ・ビー・アール・エル(GibcoBRL)社製〕、D-MEM培地〔ギブコ・ビー・アール・エル(GibcoBRL)社製〕またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。

培養は、5%CO₂存在下等の条件下で行う。培養温度は35～37℃がよく、培養時間は、通常3～7日間である。

また培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

特開平2-227075に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

このようにして生産された本発明のTPO-CSFは、通常の蛋白質の精製方法により精製することができる。

例えば、TPO-CSFが宿主細胞外へ分泌されない場合には、該形質転換体の培養液を遠心分離することにより、培養液中の細胞を集め、該細胞を洗浄した後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠沈分離することにより得られた上清から、硫酸等による塩析、ジエチルアミノエチル(DEAE)-セファロースなどの陰イオン交換クロマトグラフィー、ブチルセファロース、フェニルセファロースなどの疎水性クロマトグラフィー、分子篩を用いたゲル濾過法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を用い、TPO-CSFを精製することができる。

TPO-CSFが分泌される場合には、該形質転換体の培養上清を用いて、上述の該無細胞抽出液の上清の場合と同様の処理を行うことにより、精製されたT

P O - C S F を取得することができる。

大腸菌内に生産させる場合は、上記の方法と特開昭63-267292 に記載された方法を組み合わせることにより効率的に精製することができる。

また、本発明の T P O - C S F を、さらに他の蛋白質との融合蛋白質として生産し、融合した蛋白質に親和性をもつ物質を用いたアフィニティークロマトグラフィーを利用して精製することもできる。例えば、ロウらの方法 [John. B. Lowe ら, プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.), USA, 86, 8227 (1989)、John. B. Lowe ら, ジーンズ・アンド・ディベラプメント (Genes Develop.), 4, 1288 (1990)] に準じて、本発明の T P O - C S F をプロテイン A との融合タンパク質として生産し、イムノグロブリン G を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。

更に、G - C S F 活性を有するポリペプチドに対する抗体、例えば、G - C S F に対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製することもできる。

本発明の T P O - C S F は、そのままあるいは各種の製剤形態を取る医薬組成物として使用することができる。

本発明の医薬組成物は活性成分として、有効な量の T P O - C S F を薬理学的に許容される担体と均一に混合して製造できる。

これらの医薬組成物は、注射に対して適する単位服用形態にあることが望ましい。

注射による投与に用いる注射剤は、蒸留水、塩化ナトリウムもしくは塩化ナトリウムと無機塩との混合物等の塩溶液、マンニトール、ラクトース、デキストラン、グルコース等の糖溶液、グリシン、アルギニン等のアミノ酸溶液、有機酸溶液、有機塩基溶液、または塩溶液と糖溶液の混合溶液からなる担体を用いて調製することができる。この際、常法に従い、浸透圧調整剤、ゴマ油、ダイズ油

等の植物油、レシチンもしくは非イオン界面活性剤等の界面活性剤等の助剤を用いて、溶液、懸濁剤、分散剤として調製することができる。これらの溶液を粉末化、凍結乾燥等の操作により用時溶解製剤として調製することもできる。

本発明のTPO-CSFを有効成分として含む上記医薬組成物は、貧血を伴う疾病を有する患者、疾病の治療の結果として貧血状態になるような患者等の治療に適している。

図面の簡単な説明

第1図はTPO-ND28(1)をコードするDNAを含むプラスミドの造成を示した図である。

第2図はTPO-ND28(2)をコードするDNAを含むプラスミドの造成を示した図である。

第3図はTPO-ND28(3)をコードするDNAを含むプラスミドの造成を示した図である。

発明を実施するための最良の形態

実施例1 TPO-CSFをコードするDNAの作製

G-CSF活性を有するポリペプチドをコードするDNAとして、ヒトG-CSFのアミノ酸配列のうち、第1番目のアミノ酸残基がアラニン(Ala)に、第3番目のアミノ酸がスレオニン(Thr)に、第4番目のアミノ酸がチロシン(Tyr)に、第5番目のアミノ酸がアルギニン(Arg)に、および第17番目のアミノ酸がセリン(Ser)に全て置換されたポリペプチドであるND28をコードするDNA(特開昭63-267292)を用い、TPO活性を有するポリペプチドをコードするDNAとしては、第3表のアミノ酸配列を有するポリペプチド〔デサベジ(de Sauvage)ら、ネイチャー(Nature), 369, 533 (1994) ; 以下、TPOと略記する〕をコードするDNAを用いて以下のようにしてTPO-CSF

をコードするDNAを作製した。TPOとND28との融合ポリペプチドを以下、TPO-ND28と略す。

1. TPO遺伝子の取得

TPO-ND28を作製するために用いるTPOをコードする遺伝子（以下、TPO遺伝子と略す）は、デサベイジ(de Sauvage)らが報告した塩基配列〔ネイチャー(Nature), 369, 533 (1994)〕をもとに、PCR法により以下のようにして取得した。

TPO遺伝子の5'端塩基配列を含む配列番号7に示されたDNA（以下、プライマー1と略記する）およびTPO遺伝子の3'端塩基配列を含む配列番号8に示されたDNA（以下、プライマー2と略記する）を、アプライド・バイオシステムズ社380A・DNA合成機を用いて合成した。各々のプライマーにはクローニングが容易になるように末端に制限酵素認識配列を付加した。

該プライマー1、2、ヒト肝臓ポリA⁺mRNA〔クローンテック(Clontech)社製、商品番号CL6510-1〕mRNAおよびスーパースクリプト・プレアンプリフィケーション・システム・フォア・ファースト・ストランド・cDNA・合成キット〔SuperScript Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis Kit、ギブコ・ビー・アール・エル(GibcoBRL)社製〕を用いて、逆転写PCR法によりTPO遺伝子翻訳領域配列の増幅およびクローニングを行った。

ヒト肝臓ポリA⁺mRNA 1, 000 ngおよびオリゴ(dT) 12-18 500 ng（キットに含有）を含む0.013 mlの水溶液を70℃、10分間処理した後、氷中に1分間放置した。

該放置液に、10倍濃度の合成緩衝液(synthesis buffer) 0.002 ml、10 mM dNTP mix 0.001 ml、0.1 M DTT 0.002 ml、SuperScript II RT (200 kU/ml) 0.001 ml（いずれもキットに含有）を添加し、室温で10分間放置した後、42℃で50分間インキュベートした。インキュベート後、90℃で5分間加熱し、逆転写反応を終了させた。

該反応液にE. coli RNaseH (2, 000 U/ml ; キットに含有) 0.001 ml を加え、37℃で20分間インキュベートした。

該反応液0.005 ml、400 nM プライマー1、400 nM プライマー2、20 mM トリスー塩酸 (pH 8.2)、10 mM 塩化カリウム、0.01 mg/ml ウシ血清アルブミン (以下、BSAと略記する)、2 mM 塩化マグネシウム、6 mM 硫酸アンモニウム、0.1% トリトンX-100、10% ジメチルスルフォキシド (以下、DMSOと略記する)、0.05 mM デオキシアデノシン3リン酸 (以下、dATPと略記する)、0.05 mM デオキシシチジン3リン酸 (以下、dCTPと略記する)、0.05 mM デオキシグアノシン3リン酸 (以下、dGTPと略記する)、0.05 mM デオキシチミジン3リン酸 (以下、dTTPと略記する) を含む反応液0.1 ml に Pfu ポリメラーゼ [ストラタジーン(Stratagene)社製] 2.5 単位を加え、パーキンエルマ・シータス・DNA・サーマル・サイクラー (PERKIN ELMER CETUS DNA Thermal Cycler、宝酒造社製) を用いて、94℃/45秒、50℃/1分、72℃/2分間のインキュベーション行程を35回繰り返すことによりPCRを行った。

該反応液を用いて、フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、得られた沈殿をTE緩衝液 [10 mM トリスー塩酸 (pH 8.0)、1 mM エチレンジアミン四酢酸 (以下、EDTAと略記する)] 0.015 ml に溶解した。

該溶液に制限酵素 Hind III および Kpn I を添加し、PCRで増幅されたDNAを消化した。

該溶液をアガロースゲル電気泳動にかけ、該アガロースゲルより約1.1 kb の Hind III - Kpn I 処理DNA断片を単離した。

該DNA断片 (50 ng) とマルチクローニング部位を持つプラスミドベクター pBluescript II SK(-) [ストラタジーン(Stratagene)社製] の Hind III -

Kpn I 切断 2.9 kb 断片 (30 ng) を DNA ライゲーションキット Ver. 1 (宝酒造社製) を用いて連結した (反応液量 0.018 ml)。

該反応液を用い、大腸菌 DH5 α 株 [ギブコ・ビー・アール・エル (GibcoBRL) 社製ライブラリー・エフィシェンシー DH5 α コンピテントセル] を定法に従って形質転換し、該形質転換株を 50 μ g/ml のアンピシリンを含む LB 寒天培地に塗布後、37℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換株数株から公知の方法 [バーンボイム (Birnboim) ら ; ヌクレック・アシツ・リサーチ (Nucleic Acids Res.), 7, 1513 (1979)] に従ってプラスミドを単離した。

該プラスミド中の挿入断片の塩基配列を、タック・ダイデオキシ・ターミネータ・サイクル・シーケンス・キット [Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit、アプライド・バイオシステムズ社製、商品番号 401113] および ABI373A DNA シーケンサー [アプライド・バイオシステムズ社製] を用いて決定した。塩基配列の決定に際して、TPO 遺伝子の塩基配列 [デサベイジ (de Sauvage) ら、ネイチャー (Nature), 369, 533 (1994)] をもとに配列番号 9 ~ 13 または 14 で示される塩基配列を有する 6 つの DNA およびベクター中の塩基配列を含む配列番号 15 または 16 で示される塩基配列を有する 2 つのプライマーを合成し、塩基配列決定に用いるプライマーとして用いた。

塩基配列決定方法はキットおよび装置の説明書に従った。

該プラスミドのうち、挿入断片の塩基配列が報告されている TPO 遺伝子の塩基配列と一致したプラスミド、pBS-TPO332 を以後の操作に用いた。

2. TPO-ND28 をコードする DNA の造成とその発現

実施例 1-1. で得られた TPO をコードする DNA、および特開昭 63-26729 2 に記載された方法により得られた ND28 をコードする DNA を用いて、TPO と ND28 の融合ポリペプチド (N 末側に TPO、C 末側に ND28) TPO-ND28 を以下のようにして作製した。

1) TPO-ND 28 (1) [配列番号 2 ; リンカー(GlyGlyGlySerGlyGlyGlySerGlyGlyGlySerArg ; 配列番号 17) を介するタイプ] をコードするDNA (配列番号 5) の造成

成熟型TPOは332 アミノ酸よりなるが、このうちN末側153アミノ酸からなる短縮型蛋白質でも完全長TPOと変わらない活性を示すことが報告されている〔デサベイジ(de Sauvage)ら、ネイチャー(Nature), 369, 533 (1994)〕ことより、N末側にTPOのN末から153番目までのアミノ酸、C末側に完全長ND 28 (174アミノ酸) がリンカー(GlyGlyGlySerGlyGlyGlySerGlyGlyGlySerArg) を介して結合したTPO-ND 28 (1) をコードするDNAを、以下のようにして作製した(第1図参照)。

① TPO-ND 28 (1) のTPO部分をコードするDNAの作製

TPO-ND 28 (1) のTPO部分をコードするDNAをPCR法を用いて作製するために、3' 末側のプライマーとして、リンカーのアミノ酸配列に対応する塩基配列(配列番号18)を有するDNAプライマー(以下、プライマー3と略記する)を合成した。

このプライマー3とプライマー1およびpBS-TPO 332とを用いて、以下のようにPCRを行った。

pBS-TPO 332 10 ng、400 nM プライマー3、400 nM プライマー1、20 mM トリス-塩酸(pH 8.2)、10 mM 塩化カリウム、0.01 mg/ml BSA、2 mM 塩化マグネシウム、6 mM 硫酸アンモニウム、0.1% トリトンX-100、10% DMSO、0.05 mM dATP、0.05 mM dCTP、0.05 mM dGTP、0.05 mM dTTPを含む反応液0.1 mlにPfuポリメラーゼ 2.5単位を加え、パーキンエルマ・シートス・DNA・サーマル・サイクラー(PERKIN ELMER CETUS DNA Thermal Cycler、宝酒造社製)を用いて、94℃/45秒、50℃/1分、72℃/1分間のインキュベーション工程を18回繰り返すことによりPCRを行っ

た。

該反応液を用いて、フェノール／クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、得られた沈殿をTE緩衝液0.015mlに溶解した。

該溶液に制限酵素HindIIIおよびXbaIを添加し、PCRで増幅されたDNAを消化した。

該溶液をアガロースゲル電気泳動にかけ、該アガロースゲルより約0.6kbのHindIII-XbaI処理DNA断片を単離した。

該DNA断片(100ng)とpBluescript II SK(-)のHindIII-XbaI切断2.9kb断片(50ng)をDNAライゲーションキットVer. 1〔宝酒造社製〕を用いて連結した(反応液量0.018ml)。

該反応液を用い、大腸菌DH5 α 株を定法に従って形質転換し、該形質転換株を50 μ g/mlのアンピシリンを含むLB寒天培地に塗布後、37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。

生育してきた形質転換株数株から公知の方法に従ってプラスミドを単離した。

該プラスミド中の挿入断片の塩基配列を、タック・ダイデオキシ・ターミネータ・サイクル・シーケンス・キットおよびABI373A DNAシーケンサー〔アプライド・バイオシステムズ社製〕を用いて決定した。塩基配列の決定に際して、配列番号9～12、15および16に示した塩基配列を有するプライマーを塩基配列決定に用いるプライマーとして用いた。

塩基配列決定方法はキットおよび装置の説明書に従った。

該プラスミドのうち、挿入断片の塩基配列が報告されているTPO遺伝子の塩基配列と一致した、プラスミドpBS-T153LNDを以後の操作に用いた。

② TPO-ND28(1)のND28部分をコードするDNAの作製

TPO-ND28(1)のND28部分をコードするDNAをPCR法を用いて作製するために、5'末端のプライマーとして、リンカーおよびND28のアミノ酸配列に対応する塩基配列(配列番号19)を有するプライマー(以下、プ

ライマー 4 と略記する) を、3' 末端のプライマーとして ND 28 の C 末端側のアミノ酸配列に対応する塩基配列を含む塩基配列 (配列番号 20) を有するプライマー (以下、プライマー 5 と略記する) を合成した。

これらのプライマーおよび ND 28 をコードする DNA を含むプラスミド pCfBD 28 (特開昭 63-267292) を用いて、以下の PCR 反応を行った。

pCfBD 28 10 ng、400 nM プライマー 4、400 nM プライマー 5、20 mM トリス-塩酸 (pH 8.2)、10 mM 塩化カリウム、0.01 mg/ml BSA、2 mM 塩化マグネシウム、6 mM 硫酸アンモニウム、0.1% トリトン X-100、10% DMSO、0.05 mM dATP、0.05 mM dCTP、0.05 mM dGTP、0.05 mM dTTP を含む反応液 0.1 ml に Pfu ポリメラーゼ 2.5 単位を加え、パーキンエルマ・シートス・DNA・サーマル・サイクラー (PERKIN ELMER CETUS DNA Thermal Cycler、宝酒造社製) を用いて、94℃/45 秒、50℃/1 分、72℃/1 分間のインキュベーション行程を 18 回繰り返すことにより PCR を行った。

該反応液を用いて、フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、得られた沈殿を TE 緩衝液 0.015 ml に溶解した。

該溶液に制限酵素 Sac II および Xba I を添加し、PCR で増幅された DNA を消化した。

該溶液をアガロースゲル電気泳動にかけ、該アガロースより約 0.5 kb の Sac II-Xba I 処理 DNA 断片を単離した。

該 DNA 断片 (100 ng) と pBluescript II SK(-) の Sac II-Xba I 切断 2.9 kb 断片 (50 ng) を DNA ライゲーションキット Ver.1 (宝酒造社製) を用いて連結した (反応液量 0.018 ml)。

該反応液を用い、大腸菌 DH5 α 株を定法に従って形質転換し、該形質転換株を 50 μ g/ml のアンピシリンを含む LB 寒天培地に塗布後、37℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換株数株から公知の方法に従ってプラスミドを単離した。

該プラスミド中の挿入断片の塩基配列を、タック・ダイデオキシ・ターミネータ・サイクル・シーケンス・キットおよびABI373A DNAシーケンサーを用いて決定した。塩基配列の決定に際して、ND 2 8 をコードするDNAの塩基配列を含む配列番号 2 1 または 2 2 に示す塩基配列を有する 2 種類のDNA、およびベクターに存在する配列を含む配列番号 1 5 または 1 6 に示す塩基配列を有する 2 種類のDNAを、塩基配列決定に用いるプライマーとして用いた。

塩基配列決定方法はキットおよび装置の説明書に従った。

該プラスミドのうち、挿入断片の塩基配列がND 2 8 遺伝子およびプライマーの塩基配列と一致したプラスミド、pBS-LND 2 8 を以後の操作に用いた。

③ TPO-ND 2 8 (1) をコードするDNAの作製

実施例1-2-1)-①および②で作製したTPO部分およびND 2 8 部分を各々コードするDNAを以下のように連結した。

pBS-T 1 5 3 LND 2, 0 0 0 ngを制限酵素SacIIおよびXbaIで消化後、アガロースゲル電気泳動にかけ、約3. 5 kbのDNA断片を単離した。

また、5 0 0 ngのpBS-LND 2 8 を制限酵素SacIIおよびXbaIで消化後、アガロースゲル電気泳動にかけ、約0. 5 kbのDNA断片を単離した。

該3. 5 kbのDNA断片(1 0 0 ng)と約0. 5 kbのDNA断片(1 0 0 ng)とをDNAライゲーションキットVer.1〔宝酒造社製〕を用いて連結させた(反応液量0. 0 1 8 ml)。

該反応液を用い、大腸菌DH 5 α 株を定法に従って形質転換し、該形質転換株を5 0 μ g/mlのアンピシリンを含むLB寒天培地に塗布後、3 7 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。

生育してきた形質転換株数株から公知の方法に従ってプラスミドを単離した。

制限酵素 SacII および XbaI を用いてプラスミドの構造を調べ、両DNA断片が結合した構造を有するプラスミド、pBS-T153LND28を以後の操作に用いた。

2) TPO-ND28 (2) [配列番号1; リンカーを介さないタイプ] をコードするDNA (配列番号4) の造成

ND28 (174 アミノ酸) のN末にリンカーを介さずにTPOのN末から154番目までのアミノ酸が結合したTPO-ND28 (2) をコードするDNAを、以下のようにして作製した (第2図参照)。

① TPO-ND28 (2) のTPO部分をコードするDNAの作製

TPO-ND28 (2) のTPO部分をコードするDNAをPCR法を用いて作製するために、3'側のプライマーとして、TPOおよびND28のアミノ酸配列に対応する塩基配列を有する配列番号23に示される塩基配列を有するプライマー (以下、プライマー6と略記する) を合成した。

このプライマー6と、プライマー1およびpBS-TPO332を用いて、以下のPCRを行った。

pBS-TPO332 10 ng、400 nM プライマー1、400 nM プライマー6、20 mM トリス塩酸 (pH 8.2)、10 mM 塩化カリウム、0.01 mg/ml BSA、2 mM 塩化マグネシウム、6 mM 硫酸アンモニウム、0.1% トリトンX-100、10% DMSO、0.05 mM dATP、0.05 mM dCTP、0.05 mM dGTP、0.05 mM dTTPを含む反応液0.1 mlにPfuポリメラーゼ2.5単位を加え、パーキンエルマ・シートス・DNA・サーマル・サイクラーを用いて、94℃/45秒、50℃/1分、72℃/1分間のインキュベーション工程を18回繰り返すことによりPCRを行った。

該反応液を用いて、フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、得られた沈殿をTE緩衝液0.015 mlに溶解した。

該溶液に制限酵素H i n dIIIおよびX h oIを添加し、PCRで増幅されたDNAを消化した。

該溶液をアガロースゲル電気泳動にかけ、該アガロースゲルより約0.5 kbのH i n dIII-X h oI処理DNA断片を単離した。

該DNA断片(100 ng)とpBluescript II SK(-)のH i n dIII-X h oI切断2.9 kb断片(50 ng)をDNAライゲーションキットVer. 1(宝酒造社製)を用いて連結した(反応液量0.018 ml)。

該反応液を用い、大腸菌DH5 α 株を定法に従って形質転換し、該形質転換株を50 μ g/mlのアンピシリンを含むLB寒天培地に塗布後、37℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換株数株から公知の方法に従ってプラスミドを単離した。

該プラスミド中の挿入断片の塩基配列を、タック・ダイデオキシ・ターミネータ・サイクル・シーケンス・キットおよびABI373A DNAシーケンサ〔アプライド・バイオシステムズ社製〕を用いて決定した。塩基配列の決定に際して、配列番号9～12、15および16に示した塩基配列を有するプライマーを塩基配列決定に用いるプライマーとして用いた。

塩基配列決定方法はキットおよび装置の説明書に従った。

該プラスミドのうち、挿入断片の塩基配列がTPO遺伝子およびプライマーの塩基配列と一致した、プラスミドpBS-T154NDを以後の操作に用いた。

② TPO-ND28(2)をコードするDNAの作製

実施例1-2-2)-①で作製したTPO部分をコードするDNAと実施例1-2-1)-②で作製したND28部分をコードするDNAとを以下のようにして連結した。

pBS-T154ND200 ngを制限酵素K p nIおよびX h oIで消化後、アガロースゲル電気泳動にかけ、約3.5 kbのDNA断片を単離した。

また、pBS-LND28の500 ngを制限酵素K p nIおよびX h oIで消化後、アガロースゲル電気泳動にかけ、約0.5 kbのDNA断片を単離した。

該 3.5 kb の DNA 断片 (100 ng) と約 0.5 kb の DNA 断片 (100 ng) とを DNA ライゲーションキット Ver.1 [宝酒造社製] を用いて連結させた (反応液量 0.018 ml)。

該反応液を用い、大腸菌 DH5 α 株を定法に従って形質転換し、該形質転換株を 50 μ g/ml のアンピシリンを含む LB 寒天培地に塗布後、37℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換株数株から公知の方法に従ってプラスミドを単離した。

制限酵素 KpnII および XhoI を用いてプラスミドの構造を調べ、両 DNA 断片が結合した構造を有するプラスミド、pBS-T154ND28 を以後の操作に用いた。

3) TPO-ND28 (3) [配列番号 3 ; リンカー (SerGlyGlyGlySerGlyGlyGlySerGlyGlyGlySerGlyGlyArg ; 配列番号 24) を介するタイプ] をコードする DNA (配列番号 6) の造成

N 末側に TPO の N 末から 153 番目までのアミノ酸、C 末側に完全長 ND28 (174 アミノ酸) がリンカー (SerGlyGlyGlySerGlyGlyGlySerGlyGlyGlySerGlyGlyArg) を介して結合した TPO-ND28 (3) をコードする DNA を、以下のようにして作製した (第 3 図参照)。

実施例 1-2-2)-①で作製した TPO 部分をコードする DNA と実施例 1-2-1)-②で作製した ND28 部分をコードする DNA とをリンカー (SerGlyGlyGlySerGlyGlyGlySerGlyGlyGlySerGlyGlyArg) を介して結合させるために、リンカーのアミノ酸配列に対応し、両端が Sp1I - BbeI 相補的な末端を生じる塩基配列を有する、配列番号 25 および 26 に示す 2 種類の DNA を合成した。

配列番号 25 で示された DNA を 0.01 mM、5 mM ATP、50 mM トリス-塩酸 (pH 8.0)、10 mM 塩化マグネシウムおよび 5 mM ジチオスレイトールを含む溶液 0.02 ml に T4・ポリヌクレオチド・キナーゼ (T4

Polynucleotide Kinase、宝酒造社製）10単位を加え、37℃で30分間放置後、70℃で3分間加熱し、処理液1を得た。

配列番号26で示されたDNAについても同様の操作を行い、処理液（2）を得た。

処理液（1）および処理液（2）を混合して、90℃で5分間保温後、3時間かけて22℃に冷却し、二本鎖DNAを作製した。

該二本鎖DNAを実施例1-2-2)-②で取得したpBS-T154ND28のTPOをコードする遺伝子とND28をコードする遺伝子の連結部位に以下のように挿入した。

pBS-T154ND28 2,000ngを制限酵素BbeIおよびSplIで消化後アガロースゲル電気泳動にかけ、約4.0kbのDNA断片を単離した。

該約4.0kbのDNA断片（100ng）と上記二本鎖DNA（12.5pmole）とをDNAライゲーションキットVer.1〔宝酒造社製〕を用いて連結させた（反応液量0.018ml）。

該反応液を用い、大腸菌DH5α株を定法に従って形質転換し、該形質転換株を50μg/mlのアンピシリンを含むLB寒天培地に塗布後、37℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換株数株から公知の方法に従ってプラスミドを単離した。

該プラスミド中の挿入断片の塩基配列を、タック・ダイデオキシ・ターミネータ・サイクル・シーケンス・キットおよびABI373A DNAシーケンサーを用いて決定した。塩基配列を決定する際に、配列番号12および配列番号22に示される2種類のDNAをプライマーとして用いた。塩基配列決定法はキットおよび装置の説明書に従った。

該プラスミドのうち、挿入断片の塩基配列がリンカーDNAの塩基配列と一致したプラスミド、pBS-153ND28LN1を以後の操作に用いた。

実施例2 TPO-CSFの生産

TPO-CSFをコードするDNAを動物細胞で以下のようにして発現させ、TPO-CSFを生産した。

1) TPO-ND28 (1) およびTPO-ND28 (2) の生産

プラスミドp cDNA3 [インヴィトロジェン(Invitrogen)社製] をE c o R I およびN o t I で消化後アガロースゲル電気泳動にかけ、約5.4 kbのDNA断片(ベクター側)を単離した。

また、実施例1-2-1)-③および実施例1-2-2)-②で取得したpBS-T153LND28およびpBS-T154ND28をそれぞれE c o R I およびN o t I で消化後、アガロースゲル電気泳動にかけ、各々より約1.1 kbのDNA断片(インサート側)を単離した。

ベクター側約5.4 kbのDNA断片(100 ng)と各インサート側DNA断片(100 ng)を、DNAライゲーションキットVer.1を用いて連結させた(反応液量各0.018 ml)。

該反応液を用い、大腸菌DH5 α 株を定法に従って形質転換し、該形質転換株を50 μ g/mlのアンピシリンを含むLB寒天培地に塗布後、37℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換株数株から公知の方法に従ってプラスミドを単離した。

制限酵素E c o R I およびN o t Iを用いてプラスミドの構造を調べ、ベクター側およびインサート側DNA断片が結合した構造を有するプラスミドを各々のインサートにつき選択し、TPO-ND28 (1)をコードする遺伝子を含むプラスミドpCD-153LND28およびTPO-ND28 (2)をコードする遺伝子を含むプラスミド、pCD-154ND28を以後の操作に用いた。

pCD-153LND28またはpCD-154ND28をエレクトロポレーション法〔ポッター(Potter)ら、プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.) USA., 81, 7161 (1984)〕により動物細胞に導入し、以下のようにして発現を行った。

COS7細胞を10% ウシ胎仔血清を添加したD-MEM培地〔ギブコ・ビー・アール・エル(GibcoBRL)社製、商品番号11885-50〕中で培養した。

該培養により得られたCOS 7細胞をK-PBS緩衝液〔137mM 塩化カリウム、2.7mM 塩化ナトリウム、8.1mM リン酸一水素二ナトリウム、1.5mM リン酸二水素一ナトリウム、4mM 塩化マグネシウム〕に懸濁し、 8×10^8 細胞/mlの細胞懸濁液を調製した。

該懸濁液0.2mlを溝幅0.2cmのパルサーキュベット〔Pulser Cuvette、バイオラッド(BIO-RAD) 社製〕に注入した。

該キュベットにpCD-153LND28またはpCD-154ND28を4 μ g加え、よく混合した後、エレクトロポレーション装置ジーンパルサー〔Gene Pulser、バイオラッド(BIO-RAD) 社製〕を用い、200 Ω 、0.3kV/cm、0.125mFの条件でパルス印加を行った。

該パルス処理液を氷中に5分間静置後、10% ウシ胎仔血清を添加したD-MEM培地10mlに懸濁し、CO₂インキュベーター中、37℃で72時間培養した。

該培養液を遠心分離し、得られた培養上清を孔径220nmのフィルターを用いて濾過することにより、TPO-ND28 (1) またはTPO-ND28 (2) 溶液を得た。

2) TPO-ND28 (3) の生産

TPO-ND28 (3) を発現させるためのベクターとしてpAGE210を用いた。pAGE210は、pAGE248〔佐々木(Sasaki)ら、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J.Biol.Chem.), 269, 14730 (1994)〕の誘導体であり、pAGE248のモロニー・ムリン・リ्यूケミア・バイラス・プロモーター (Moloney murine leukemia virus promoter, XhoI-HindIII断片) をpAGE103〔水上(Mizukami)ら、ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J.Biochem.), 101, 1307 (1987)〕のSV40 アーリー・プロモーター (SV40 early promoter, XhoI-HindIII断片) で置き換えられたベクターである。

pAGE210をKpnIおよびHindIIIで消化後、アガロースゲル電気泳動にかけ、約9.0kbのDNA断片 (ベクター側) を単離した。

別に、実施例1-1で取得したpBS-TPO332をKpnIおよびHindIII

II消化したもの、および、実施例1-2-3)で取得したpBS-153ND28LN1をKpnIで消化後HindIIIで部分消化したものをそれぞれアガロースゲル電気泳動にかけ、各々約1.1kbのDNA断片(インサート側)を単離した。

ベクター側約9.0kbDNA断片(100ng)と各インサート側約1.1kbDNA断片(100ng)を、DNAライゲーションキットVer.1を用いて連結した(反応液量0.012ml)。

該反応液を用い、大腸菌DH5 α 株を定法に従って形質転換し、該形質転換株を50 μ g/mlのアンピシリンを含むLB寒天培地に塗布後、37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。

生育してきた形質転換株数株から公知の方法に従ってプラスミドを単離した。

制限酵素KpnIを用いてプラスミドの構造を調べ、ベクター側およびインサート側DNA断片が結合した構造を有するプラスミドを各々のインサートにつき選択し、TPOをコードする遺伝子を含むプラスミドpAGE210-T332およびTPO-ND28(3)をコードする遺伝子を含むプラスミドpAGE210-LN1を以後の操作に用いた。

pAGE210-T332またはpAGE210-LN1をエレクトロポレーション法により動物細胞に導入した。

CHO細胞を10%ウシ胎仔血清を添加したMEM培地(1)〔ギブコ・ビー・アール・エル(GibcoBRL)社製、コード番号19000-024〕中で培養した。

該培養により得られたCHO細胞をK-PBS緩衝液に懸濁し、 8×10^6 細胞/mlの細胞懸濁液を調製した。

該懸濁液0.2mlを溝幅0.2cmのバルサーキューベットに注入した。

該キューベットにpAGE210-T332またはpAGE210-LN1を4 μ g加え、充分混合した後、エレクトロポレーション装置ジーンバルサーを用いて、0.35kV/cm、0.25mFの条件でパルス印加を行った。

該パルス処理液を氷中5分間静置した後、10%ウシ胎仔血清を添加したMEM培地10mlに懸濁し、CO₂インキュベーターにて37 $^{\circ}$ Cで24時間培養した。

該培養細胞を10%ウシ胎仔血清およびハイグロマイシンを0.3mg/ml添加したMEM培地(1)で2週間培養した。

該培養細胞を10%ウシ胎仔血清およびメトトレキサート(以下、MTXと略す)を50nM添加したMEM培地(2)〔ギブコ・ビー・アール・エル社製、コード番号12000-022〕で2週間培養した。

同様に、100nM、500nM、1000nMとMTX濃度を順次増加させた培地で培養し、1000nM MTX耐性株を取得した。

該1000nM MTX耐性各株を10%ウシ胎仔血清を添加したMEM培地(2)で生育させ、CHO細胞用無血清培地CHO-S-SFMII〔ギブコ・ビー・アール・エル社製、コード番号12052-015〕に交換し、96から144時間培養した。

該培養液を遠心分離することにより、TPOまたはTPO-ND28(3)を含有する培養上清を得た。

実施例3 TPO-ND28(3)およびTPOの精製

実施例2-2)で取得したTPO-ND28(3)またはTPO1000mlをセントリプレップ(centriprep、アミコン社製)を用いて50mlまで濃縮し濃縮液を作製した。

XK50カラム(ファルマシア社製)にセファクリルS-200(Sephacryl S-200樹脂、ファルマシア社製)1000mlを充填しリン酸緩衝液〔9.4mMリン酸ナトリウム(pH7.2)、137mM NaCl、2.7mM KCl〕を満たしておいたカラムに、該濃縮液50mlを通塔した。

リン酸緩衝液を3ml/分の速さでカラムに流し、TPO-ND28(3)またはTPOを溶出した。

該溶出液を12.5分ごとに分画し、後述のMTTアッセイ法によりTPOおよびG-CSF活性を測定することによりTPO-ND28(3)またはTPOの精製物を取得した。

実施例4 TPO-ND28(3)のポリエチレングリコールによる修飾

20kd ポリエチレングリコール-サクシンイミジル プロピオネイト (20kd

PEG-Succinimidyl Propionate、シェアーウオターポリマーズ社製)を400mg/mlになるよう氷冷水に加えた。

該水溶液50 μ l、実施例3で取得したTPO-ND28(3)溶液200 μ lおよび蒸留水150 μ lを混合し、4℃で12時間反応させ、TPO-ND28(3)のポリエチレングリコールによる修飾を行った。

ポリエチレングリコールにより修飾したTPO-ND28(3)〔以下、PEG-TPO-ND28(3)と略す〕を、予めリン酸緩衝液(9.4mMリン酸ナトリウム(pH 7.2)、137mM NaCl、2.7mM KCl)で満たしておいたスーパーローズ610/30(ファルマシア社製)に通塔した。

リン酸緩衝液を0.5ml/分の速さでカラムに流し、溶出を行った。

該溶出液を1分おきに分画し、後述のMTTアッセイ法によりG-CSF活性およびTPO活性を調べた。

結果を第5表に示した。

溶出時間34から40分に未修飾のTPO-ND28(3)に由来するG-CSF活性およびTPO活性が検出され、16から28分にPEG-TPO-ND28(3)に由来するG-CSF活性およびTPO活性が検出された。

該結果よりG-CSF活性およびTPO活性の両活性を有する、ポリエチレングリコールにより修飾されたTPO-CSFを取得可能であることがわかった。

第5表

溶出時間(分)	0	10	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40
G-CSF活性	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
TPO活性	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+

-: 活性なし +: 活性あり

試験例1 TPO-ND28の分子量の測定

実施例2-1)で取得したTPO-ND28(1)溶液を用い、ゲル濾過クロマト

グラフィーにより、以下のようにして分子量を測定した。

予めリン酸緩衝液〔9.4 mM リン酸ナトリウム (pH 7.2)、137 mM NaCl、2.7 mM KCl〕で調製しておいたスーパーローズ 610/30 (ファルマシア社製) に TPO-ND 28 (1) 溶液 0.2 ml を通塔し、リン酸緩衝液を 0.5 ml/分の速さでカラムに流し TPO-ND 28 (1) を溶出した。

溶出液を 0.5 分おきに分画して TPO 活性ならびに G-CSF 活性を後述の MTT アッセイにより測定した。

第 6 表にスーパーローズからの溶出時間と TPO および G-CSF 活性の測定値を示した。

TPO および G-CSF 活性は溶出時間 33.5 分で最大であった。

別に、分子量の標準となる蛋白質であるチログロブリン (分子量 67 万)、アルドラーゼ (分子量 16 万)、ウシ血清アルブミン (分子量 6.9 万)、G-CSF (分子量 2 万) をスーパーローズに流して、溶出時間と分子量との相関を求めた。

溶出時間 33.5 分から推定される TPO-ND 28 (1) の分子量は約 4 万であった。

第 6 表

溶出時間 (分)	0	20	30	32	33	33.5	34	35	37	42
TPO 活性 (A ₅₄₀)	0.08	0.07	0.08	0.19	0.30	0.32	0.29	0.18	0.09	0.08
G-CSF 活性 (A ₅₄₀)	0.00	0.00	0.03	0.14	0.29	0.32	0.30	0.22	0.05	0.00

試験例 2 TPO-CSF の生物学的活性

被検定細胞における、被検定液 (TPO-ND 28 溶液) による細胞増殖刺激活性を測定するための基本的な構成は以下の通りである。

被検定液（TPO-ND 28 溶液）、TPO 標準溶液およびND 28 標準溶液について、各々10倍連続希釈溶液を調製し、それぞれを微量検定皿の各ウェルに0.01mlずつ添加する。

活発に増殖している被検定細胞を培養物から遠心分離により収穫、洗浄後、各検定用に最適な細胞濃度となるように検定用の培地に再懸濁する。

被検定希釈液、TPO 標準希釈液またはND 28 標準希釈液を0.01mlずつ添加しておいた、上記微量検定皿の各ウェルに、該細胞懸濁液を0.09mlずつ添加する。

該微量検定皿を37℃、5% CO₂で完全に湿ったインキュベーター中にインキュベートした後、以下の検定を行う。

各ウェルに0.5mg/mlのMTT [3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] 0.01mlを添加し4時間インキュベート後、0.1N 塩酸/イソプロピルアルコール液を0.15ml添加し、攪拌して細胞より色素抽出した後、該色素量を540nmの吸光度で測定することにより細胞増殖を判定した。

以後、細胞増殖刺激活性を測定するための上記測定法をMTTアッセイとよぶ。

(1) Ba/F3細胞に対する細胞増殖刺激活性の測定

マウスIL-3の存在に依存して増殖するBa/F3細胞を、イスコーブ改変ダルベッコ培地（以下、IMDMと略記する）に10% 加熱不活性胎児血清（以下、FCSと略記する）およびマウスIL-3（WEHI-3Bの培養上清）を添加した培地で培養した。

該培養Ba/F3細胞を用い、マウスIL-3の存在しない上記と同じ組成の培地を用いMTTアッセイによる細胞増殖刺激活性の測定を行った。

細胞の播種密度は1ウェル当たり10,000細胞で、プレートを5% CO₂中で48時間インキュベートする条件でMTTアッセイを行った。

MTTアッセイの結果、TPO、ND 28、TPO-ND 28 (1)、(2) および(3) いずれもBa/F3細胞の細胞増殖刺激活性を有しなかった。

(2) Ba/F3-cmpl に対する細胞増殖刺激活性の測定

マウス IL-3 または TPO の存在に依存して増殖する Ba/F3-cmpl 細胞を、IMDM に 10% 加熱不活化 FCS、0.5 mg/ml G418 およびマウス IL-3 (WEHI-3B の培養上清) を添加した培地で培養した。

該培養 Ba/F3-cmpl 細胞を用い、マウス IL-3 の存在しない上記と同じ組成の培地を用い MTT アッセイによる細胞増殖刺激活性の測定を行った。

細胞の播種密度は 1 ウェル当たり 10,000 細胞で、プレートに 5% CO₂ 中で 48 時間インキュベートする条件で MTT アッセイを行った。

MTT アッセイの結果、TPO、TPO-ND28 (1)、(2) および (3) は Ba/F3-cmpl 細胞の細胞増殖刺激活性を有していた。

(3) NFS-60 細胞に対する細胞増殖刺激活性の測定

ヒト G-CSF またはマウス IL-3 の存在に依存して増殖する NFS-60 細胞を、RPMI 培地に 10% 加熱不活化 FCS、2 mM グルタミン、P/S (100 U/ml ペニシリン、100 mg/ml ストレプトマイシン) および 1.0 ng/ml の組換え型ヒト G-CSF を添加した培地で培養した。

該培養 NFS-60 細胞を用い、G-CSF の存在しない上記と同じ組成の培地を用い MTT アッセイによる細胞増殖刺激活性の測定を行った。

細胞の播種密度は 1 ウェル当たり 10,000 細胞で、プレートに 5% CO₂ 中で 48 時間インキュベートする条件で MTT アッセイを行った。

MTT アッセイの結果、ND28、TPO-ND28 (1)、(2) および (3) は NFS-60 細胞の細胞増殖刺激活性を有していた。

試験例 3 TPO-ND28 のマウス骨髄細胞に及ぼす影響

8 週令 BALB/c マウスを屠殺後、大腿骨、脛骨を取りだし両端を鋏で切断した。該大腿骨、脛骨の切断片に 10% FCS を含む RPMI 溶液を入れた注射器の針を挿入し骨髄細胞を小試験管に吹きだし、5 分間静置した。

該試験管より、パスツールピペットで沈殿物を取らないように上清を吸い上げ、該上清をニコプレップ 1.077 アニマル (Nycoprep 1.077 Animal; ニコメッド (NYCOMED) 社製、商品番号 1002380) の上に重層し、600 g で 15 分間遠心分離

することによりマウス単核細胞 (Mono Nuclear cells : 以下、MNCと略す) を単離した。

被検定液、FCS 10%、BSA 1%およびトランスフェリン [Transferrin、ベーリンガー・マンハイム (Boehringer manheim) 社製] 0.6 mg/ml を含有する溶液で、該MNCを 5×10^5 細胞/ml となるように調製し、CO₂ インキュベータ (CO₂ incubator BNA-120D、タバイ (TABAI) 社製) 中で37℃、5% CO₂、95%以上の湿度の条件のもと5日間培養した。

このときの被検定液としては、最終濃度1.0、10、100 ng/mlのTp_o、ND28またはTp_o-ND28溶液、あるいは該濃度のTp_oとND-28を等量混合した溶液 (Tp_o/ND28) を用いた。Tp_oおよびND-28は実施例3で取得したものをを用いた。

該培養後、MNCの分化の状態を、巨核球系への分化の指標であるCD61 [ジャーナル オブ メディシン (J. Med.) 311, 1084 (1984)] の発現量、顆粒球系への分化の指標であるGr-1 [ジャーナル オブ イムノロジー (J. Immunol.) 144, 22 (1991)] の発現量を測定することにより調べた。

抗マウスCD61-FITC抗体 [anti mouse CD61-FITC Monoclonal Antibody、ファーマンジェン (PHARMINGEN) 社製、商品番号01864D] および抗マウスGr-1-PE抗体 [anti mouse Gr-1-PE Monoclonal Antibody、ファーマンジェン (PHARMINGEN) 社製、商品番号01215A] で染色した後、エリート フロー サイトメーター [ELITE flow cytometer、コールター (Coulter) 社製] を用いてCD61、Gr-1の発現量を測定した。

結果を第7表に示した。

第 7 表

被検液	濃度 (ng/ml)	発現細胞 (%)	
		Gr-1	CD61
無添加		1.0	1.0
ND28	1.0	49.1	7.6
	10.0	40.7	4.9
	100.0	44.5	4.6
Tpo	1.0	36.7	8.7
	10.0	37.7	17.8
	100.0	37.1	21.9
Tpo/ND28	1.0	50.7	10.3
	10.0	40.6	10.4
	100.0	49.2	5.7
Tpo-ND28	1.0	50.5	22.1
	10.0	49.8	26.6
	100.0	41.0	18.8

TPOとND28を等量混合した被検液(TPO/ND28)を添加した場合には、ND28単独の被検液を添加したときと同程度に、Gr-1発現細胞が出現し、MNCが顆粒球系へ分化していたが、CD61発現細胞の出現率は、TPO単独の被検液を添加したときよりも低くなり、巨核球系への分化が減少していた。このことは等量のTPOとND28が存在する場合、MNCはよりND28に反応して顆粒球系への分化が進むことを示唆している。

しかしながら、TPOとND28の融合ポリペプチドであるTPO-ND28を被検液として添加した場合には、CD61発現細胞の出現率は、TPO単独の被検液を添加したときと同等以上であり、TPO/ND28添加の場合の2倍以上であった。しかも、Gr-1発現細胞の出現率も、ND28単独の被検液を添加したときと同等であった。

試験例 4 マウスにおける血小板および白血球産生促進作用

BALB/cマウス(雄、7週齢)に実施例3で取得したTPO 10 μ g/mlまたはTPO-ND28 (3) 10 μ g/ml溶液をマウスの体重20gあたり0.2mlの投与容量で試験の1日目より1日1回連続4日間皮下投与し

た（処理群、1群4匹）。試験の5日目に個体毎に眼底静脈より採決しマイクロセルカウンター（東亜医用電子社製、Sysmex F800）により血小板および白血球数を計測した。

実施例2-2)に記載した方法により、TPOまたはTPO-ND28(3)遺伝子を発現させるために用いたプラスミドpAGE210をCHO細胞に導入後、培養し、該培養上清を用いて、実施例3に記載したTPO-ND28(3)の精製と同じ操作を行い、TPO-ND28(3)の溶出画分に相応する溶出画分をブランク溶液として用い、上記と同様の操作を行い、血小板および白血球数を計測した。

TPOおよびTPO-ND28(3)の効果を比較検討するために、ブランク溶液投与群に対する両物質投与群の血小板および白血球数の増加率(%)を次式から算出した。

$$\frac{\text{TPOあるいはTPO-ND28(3)投与群マウスの血小板あるいは白血球数}}{\text{ブランク溶液投与群マウスの血小板あるいは白血球数}} \times 100$$

結果を第8表に示した。

第 8 表

試験物質	血小板増加率 (%)	白血球増加率 (%)
TPO	219	106
TPO-ND28	170	160

産業上の利用可能性

本発明により、G-CSF活性を有するポリペプチドとTPO活性を有するポリペプチドとからなる融合ポリペプチドが提供される。本発明の融合ポリペプチドは、血小板と好中球とを同時に生成・増幅させることができ、巨核球コロニー形成ならびに好中球コロニー形成、巨核球前駆体および好中球前駆体の分化または成熟を制御することができる。

配 列 表

配列番号：1

配列の長さ：328

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源

生物名：ヒト(Homo sapiens)

配列の特徴：

特徴を表す記号：

存在位置：1..154

特徴を表す記号：

存在位置：154..328

配列

Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Cys	Asp	Leu	Arg	Val	Leu	Ser	Lys	Leu	Leu
1				5					10					15	
Arg	Asp	Ser	His	Val	Leu	His	Ser	Arg	Leu	Ser	Gln	Cys	Pro	Glu	Val
			20					25					30		
His	Pro	Leu	Pro	Thr	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Ala	Val	Asp	Phe	Ser	Leu
		35					40					45			
Gly	Glu	Trp	Lys	Thr	Gln	Met	Glu	Glu	Thr	Lys	Ala	Gln	Asp	Ile	Leu
	50					55					60				
Gly	Ala	Val	Thr	Leu	Leu	Leu	Glu	Gly	Val	Met	Ala	Ala	Arg	Gly	Gln
65					70					75				80	
Leu	Gly	Pro	Thr	Cys	Leu	Ser	Ser	Leu	Leu	Gly	Gln	Leu	Ser	Gly	Gln
				85					90					95	
Val	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Leu	Gln	Ser	Leu	Leu	Gly	Thr	Gln	Leu
			100					105						110	

Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala Ile Phe
 115 120 125
 Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu Met Leu
 130 135 140
 Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala Pro Thr Tyr Arg Ala
 145 150 155 160
 Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Ser Leu Glu Gln Val Arg
 165 170 175
 Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr
 180 185 190
 Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu
 195 200 205
 Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln
 210 215 220
 Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln
 225 230 235 240
 Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr
 245 250 255
 Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp
 260 265 270
 Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln
 275 280 285
 Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly
 290 295 300
 Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg
 305 310 315 320
 Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
 325

配列番号：2

配列の長さ：340

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源

生物名：ヒト (Homo sapiens)

配列の特徴：

特徴を表す記号：

存在位置：1..153

特徴を表す記号：

存在位置：167..340

配列

Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Cys	Asp	Leu	Arg	Val	Leu	Ser	Lys	Leu	Leu
1				5					10					15	
Arg	Asp	Ser	His	Val	Leu	His	Ser	Arg	Leu	Ser	Gln	Cys	Pro	Glu	Val
			20					25					30		
His	Pro	Leu	Pro	Thr	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Ala	Val	Asp	Phe	Ser	Leu
		35				40					45				
Gly	Glu	Trp	Lys	Thr	Gln	Met	Glu	Glu	Thr	Lys	Ala	Gln	Asp	Ile	Leu
	50				55					60					
Gly	Ala	Val	Thr	Leu	Leu	Leu	Glu	Gly	Val	Met	Ala	Ala	Arg	Gly	Gln
	65				70				75					80	
Leu	Gly	Pro	Thr	Cys	Leu	Ser	Ser	Leu	Leu	Gly	Gln	Leu	Ser	Gly	Gln
			85					90					95		
Val	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Leu	Gln	Ser	Leu	Leu	Gly	Thr	Gln	Leu
		100					105					110			
Pro	Pro	Gln	Gly	Arg	Thr	Thr	Ala	His	Lys	Asp	Pro	Asn	Ala	Ile	Phe

115	120	125
Leu Ser Phe Gln His Leu	Leu Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu Met Leu	
130	135	140
Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
145	150	155
Ser Gly Gly Gly Ser Arg Ala Pro Thr Tyr Arg Ala Ser Ser Leu Pro		
165	170	175
Gln Ser Phe Leu Leu Lys Ser Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly		
180	185	190
Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys		
195	200	205
His Pro Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp		
210	215	220
Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys		
225	230	235
Leu Ser Gln Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln		
245	250	255
Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu		
260	265	270
Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu		
275	280	285
Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro		
290	295	300
Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala		
305	310	315
Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His		
325	330	335
Leu Ala Gln Pro		
340		

配列番号：3

配列の長さ：344

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源

生物名：ヒト(Homo sapiens)

配列の特徴：

特徴を表す記号：

存在位置：1..153

特徴を表す記号：

存在位置：171..344

配列

Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Cys	Asp	Leu	Arg	Val	Leu	Ser	Lys	Leu	Leu
1				5					10					15	
Arg	Asp	Ser	His	Val	Leu	His	Ser	Arg	Leu	Ser	Gln	Cys	Pro	Glu	Val
			20					25					30		
His	Pro	Leu	Pro	Thr	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Ala	Val	Asp	Phe	Ser	Leu
		35				40					45				
Gly	Glu	Trp	Lys	Thr	Gln	Met	Glu	Glu	Thr	Lys	Ala	Gln	Asp	Ile	Leu
	50				55						60				
Gly	Ala	Val	Thr	Leu	Leu	Leu	Glu	Gly	Val	Met	Ala	Ala	Arg	Gly	Gln
	65				70				75					80	
Leu	Gly	Pro	Thr	Cys	Leu	Ser	Ser	Leu	Leu	Gly	Gln	Leu	Ser	Gly	Gln
			85					90					95		
Val	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Leu	Gln	Ser	Leu	Leu	Gly	Thr	Gln	Leu
			100					105					110		

Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala Ile Phe
 115 120 125
 Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu Met Leu
 130 135 140
 Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 145 150 155 160
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Arg Ala Pro Thr Tyr Arg Ala
 165 170 175
 Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Ser Leu Glu Gln Val Arg
 180 185 190
 Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr
 195 200 205
 Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu
 210 215 220
 Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln
 225 230 235 240
 Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln
 245 250 255
 Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr
 260 265 270
 Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp
 275 280 285
 Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln
 290 295 300
 Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly
 305 310 315 320
 Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg
 325 330 335
 Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro

340

配列番号：4

配列の長さ：1047

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

起源

生物名：ヒト (Homo sapiens)

配列の特徴：

特徴を表す記号：sig peptide

存在位置：1..63

特徴を表す記号：CDS

存在位置：64..1047

配列

ATG GAG CTG ACT GAA TTG CTC CTC GTG GTC ATG CTT CTC CTA ACT GCA	48
Met Glu Leu Thr Glu Leu Leu Leu Val Val Met Leu Leu Leu Thr Ala	
-20 -15 -10	
AGG CTA ACG CTG TCC AGC CCG GCT CCT CCT GCT TGT GAC CTC CGA GTC	96
Arg Leu Thr Leu Ser Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val	
-5 1 5 10	
CTC AGT AAA CTG CTT CGT GAC TCC CAT GTC CTT CAC AGC AGA CTG AGC	144
Leu Ser Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser	
15 20 25	
CAG TGC CCA GAG GTT CAC CCT TTG CCT ACA CCT GTC CTG CTG CCT GCT	192
Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala	
30 35 40	
GTG GAC TTT AGC TTG GGA GAA TGG AAA ACC CAG ATG GAG GAG ACC AAG	240

Val	Asp	Phe	Ser	Leu	Gly	Glu	Trp	Lys	Thr	Gln	Met	Glu	Glu	Thr	Lys	
45						50					55					
GCA	CAG	GAC	ATT	CTG	GGA	GCA	GTG	ACC	CTT	CTG	CTG	GAG	GGA	GTG	ATG	288
Ala	Gln	Asp	Ile	Leu	Gly	Ala	Val	Thr	Leu	Leu	Leu	Glu	Gly	Val	Met	
60					65					70					75	
GCA	GCA	CGG	GGA	CAA	CTG	GGA	CCC	ACT	TGC	CTC	TCA	TCC	CTC	CTG	GGG	336
Ala	Ala	Arg	Gly	Gln	Leu	Gly	Pro	Thr	Cys	Leu	Ser	Ser	Leu	Leu	Gly	
				80					85					90		
CAG	CTT	TCT	GGA	CAG	GTC	CGT	CTC	CTC	CTT	GGG	GCC	CTG	CAG	AGC	CTC	384
Gln	Leu	Ser	Gly	Gln	Val	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Leu	Gln	Ser	Leu	
			95					100					105			
CTT	GGA	ACC	CAG	CTT	CCT	CCA	CAG	GGC	AGG	ACC	ACA	GCT	CAC	AAG	GAT	432
Leu	Gly	Thr	Gln	Leu	Pro	Pro	Gln	Gly	Arg	Thr	Thr	Ala	His	Lys	Asp	
			110				115					120				
CCC	AAT	GCC	ATC	TTC	CTG	AGC	TTC	CAA	CAC	CTG	CTC	CGA	GGA	AAG	GTG	480
Pro	Asn	Ala	Ile	Phe	Leu	Ser	Phe	Gln	His	Leu	Leu	Arg	Gly	Lys	Val	
			125				130					135				
CGT	TTC	CTG	ATG	CTT	GTA	GGA	GGG	TCC	ACC	CTC	TGC	GTA	CGG	CGG	GCG	528
Arg	Phe	Leu	Met	Leu	Val	Gly	Gly	Ser	Thr	Leu	Cys	Val	Arg	Arg	Ala	
			140			145				150					155	
CCA	ACA	TAT	CGC	GCC	TCG	AGT	CTA	CCA	CAG	AGC	TTC	CTT	TTA	AAA	AGC	576
Pro	Thr	Tyr	Arg	Ala	Ser	Ser	Leu	Pro	Gln	Ser	Phe	Leu	Leu	Lys	Ser	
				160					165					170		
TTA	GAG	CAA	GTG	AGG	AAG	ATC	CAG	GGC	GAT	GGC	GCA	GCG	CTC	CAG	GAG	624
Leu	Glu	Gln	Val	Arg	Lys	Ile	Gln	Gly	Asp	Gly	Ala	Ala	Leu	Gln	Glu	
			175					180						185		
AAG	CTG	TGT	GCC	ACC	TAC	AAG	CTG	TGC	CAC	CCC	GAG	GAG	CTG	GTG	CTG	672
Lys	Leu	Cys	Ala	Thr	Tyr	Lys	Leu	Cys	His	Pro	Glu	Glu	Leu	Val	Leu	
			190					195						200		

CTC GGA CAC TCT CTG GGC ATC CCC TGG GCT CCC CTG AGC AGC TGC CCC	720
Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro	
205 210 215	
AGC CAG GCC CTG CAG CTG GCA GGC TGC TTG AGC CAA CTC CAT AGC GGC	768
Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser Gly	
220 225 230 235	
CTT TTC CTC TAC CAG GGG CTC CTG CAG GCC CTG GAA GGG ATC TCC CCC	816
Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro	
240 245 250	
GAG TTG GGT CCC ACC TTG GAC ACA CTG CAG CTG GAC GTC GCC GAC TTT	864
Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe	
255 260 265	
GCC ACC ACC ATC TGG CAG CAG ATG GAA GAA CTG GGA ATG GCC CCT GCC	912
Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala	
270 275 280	
CTG CAG CCC ACC CAG GGT GCC ATG CCG GCC TTC GCC TCT GCT TTC CAG	960
Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln	
285 290 295	
CGC CGG GCA GGA GGG GTC CTA GTT GCC TCC CAT CTG CAG AGC TTC CTG	1008
Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe Leu	
300 305 310 315	
GAG GTG TCG TAC CGC GTT CTA CGC CAC CTT GCC CAG CCC	1047
Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro	
320 325	

配列番号 : 5

配列の長さ : 1083

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

起源

生物名：ヒト(Homo sapiens)

配列の特徴：

特徴を表す記号：sig peptide

存在位置：1..63

特徴を表す記号：CDS

存在位置：64..1083

配列

ATG GAG CTG ACT GAA TTG CTC CTC GTG GTC ATG CTT CTC CTA ACT GCA	48
Met Glu Leu Thr Glu Leu Leu Leu Val Val Met Leu Leu Leu Thr Ala	
-20 -15 -10	
AGG CTA ACG CTG TCC AGC CCG GCT CCT CCT GCT TGT GAC CTC CGA GTC	96
Arg Leu Thr Leu Ser Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val	
-5 1 5 10	
CTC AGT AAA CTG CTT CGT GAC TCC CAT GTC CTT CAC AGC AGA CTG AGC	144
Leu Ser Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser	
15 20 25	
CAG TGC CCA GAG GTT CAC CCT TTG CCT ACA CCT GTC CTG CTG CCT GCT	192
Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala	
30 35 40	
GTG GAC TTT AGC TTG GGA GAA TGG AAA ACC CAG ATG GAG GAG ACC AAG	240
Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys	
45 50 55	
GCA CAG GAC ATT CTG GGA GCA GTG ACC CTT CTG CTG GAG GGA GTG ATG	288
Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met	
60 65 70 75	
GCA GCA CGG GGA CAA CTG GGA CCC ACT TGC CTC TCA TCC CTC CTG GGG	336

Ala Ala Arg Gly Gln Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly	
80 85 90	
CAG CTT TCT GGA CAG GTC CGT CTC CTC CTT GGG GCC CTG CAG AGC CTC	384
Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu	
95 100 105	
CTT GGA ACC CAG CTT CCT CCA CAG GGC AGG ACC ACA GCT CAC AAG GAT	432
Leu Gly Thr Gln Leu Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp	
110 115 120	
CCC AAT GCC ATC TTC CTG AGC TTC CAA CAC CTG CTC CGA GGA AAG GTG	480
Pro Asn Ala Ile Phe Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val	
125 130 135	
CGT TTC CTG ATG CTT GTA GGA GGG TCC ACC CTC TGC GTC AGG GGT GGC	528
Arg Phe Leu Met Leu Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Gly Gly	
140 145 150 155	
GGT TCT GGA GGT GGT TCC GGA GGG GGT TCT AGA GCA CCA ACA TAT CGC	576
Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Arg Ala Pro Thr Tyr Arg	
160 165 170	
GCC TCG AGT CTA CCA CAG AGC TTC CTT TTA AAA AGC TTA GAG CAA GTG	624
Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Ser Leu Glu Gln Val	
175 180 185	
AGG AAG ATC CAG GGC GAT GGC GCA GCG CTC CAG GAG AAG CTG TGT GCC	672
Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys Leu Cys Ala	
190 195 200	
ACC TAC AAG CTG TGC CAC CCC GAG GAG CTG GTG CTG CTC GGA CAC TCT	720
Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser	
205 210 215	
CTG GGC ATC CCC TGG GCT CCC CTG AGC AGC TGC CCC AGC CAG GCC CTG	768
Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu	
220 225 230 235	

CAG CTG GCA GGC TGC TTG AGC CAA CTC CAT AGC GGC CTT TTC CTC TAC	816
Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr	
240 245 250	
CAG GGG CTC CTG CAG GCC CTG GAA GGG ATC TCC CCC GAG TTG GGT CCC	864
Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro	
255 260 265	
ACC TTG GAC ACA CTG CAG CTG GAC GTC GCC GAC TTT GCC ACC ACC ATC	912
Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile	
270 275 280	
TGG CAG CAG ATG GAA GAA CTG GGA ATG GCC CCT GCC CTG CAG CCC ACC	960
Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr	
285 290 295	
CAG GGT GCC ATG CCG GCC TTC GCC TCT GCT TTC CAG CGC CGG GCA GGA	1008
Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly	
300 305 310 315	
GGG GTC CTA GTT GCC TCC CAT CTG CAG AGC TTC CTG GAG GTG TCG TAC	1056
Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr	
320 325 330	
CGC GTT CTA CGC CAC CTT GCC CAG CCC	1083
Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro	
335 340	

配列番号 : 6

配列の長さ : 1095

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

起源

生物名：ヒト (Homo sapiens)

配列の特徴：

特徴を表す記号：sig peptide

存在位置：1..63

特徴を表す記号：CDS

存在位置：64..1095

配列

ATG GAG CTG ACT GAA TTG CTC CTC GTG GTC ATG CTT CTC CTA ACT GCA	48
Met Glu Leu Thr Glu Leu Leu Leu Val Val Met Leu Leu Leu Thr Ala	
-20 -15 -10	
AGG CTA ACG CTG TCC AGC CCG GCT CCT CCT GCT TGT GAC CTC CGA GTC	96
Arg Leu Thr Leu Ser Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val	
-5 1 5 10	
CTC AGT AAA CTG CTT CGT GAC TCC CAT GTC CTT CAC AGC AGA CTG AGC	144
Leu Ser Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser	
15 20 25	
CAG TGC CCA GAG GTT CAC CCT TTG CCT ACA CCT GTC CTG CTG CCT GCT	192
Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala	
30 35 40	
GTG GAC TTT AGC TTG GGA GAA TGG AAA ACC CAG ATG GAG GAG ACC AAG	240
Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys	
45 50 55	
GCA CAG GAC ATT CTG GGA GCA GTG ACC CTT CTG CTG GAG GGA GTG ATG	288
Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met	
60 65 70 75	
GCA GCA CGG GGA CAA CTG GGA CCC ACT TGC CTC TCA TCC CTC CTG GGG	336
Ala Ala Arg Gly Gln Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly	
80 85 90	
CAG CTT TCT GGA CAG GTC CGT CTC CTC CTT GGG GCC CTG CAG AGC CTC	384

Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu	
95 100 105	
CTT GGA ACC CAG CTT CCT CCA CAG GGC AGG ACC ACA GCT CAC AAG GAT	432
Leu Gly Thr Gln Leu Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp	
110 115 120	
CCC AAT GCC ATC TTC CTG AGC TTC CAA CAC CTG CTC CGA GGA AAG GTG	480
Pro Asn Ala Ile Phe Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val	
125 130 135	
CGT TTC CTG ATG CTT GTA GGA GGG TCC ACC CTC TGC GTA CGG TCC GGA	528
Arg Phe Leu Met Leu Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Ser Gly	
140 145 150 155	
GGT GGC TCT GGC GGT GGT TCT GGT GGC GGC TCC GGA GGC GGT CGT GCG	576
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Arg Ala	
160 165 170	
CCA ACA TAT CGC GCC TCG AGT CTA CCA CAG AGC TTC CTT TTA AAA AGC	624
Pro Thr Tyr Arg Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Ser	
175 180 185	
TTA GAG CAA GTG AGG AAG ATC CAG GGC GAT GGC GCA GCG CTC CAG GAG	672
Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu	
190 195 200	
AAG CTG TGT GCC ACC TAC AAG CTG TGC CAC CCC GAG GAG CTG GTG CTG	720
Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu	
205 210 215	
CTC GGA CAC TCT CTG GGC ATC CCC TGG GCT CCC CTG AGC AGC TGC CCC	768
Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro	
220 225 230 235	
AGC CAG GCC CTG CAG CTG GCA GGC TGC TTG AGC CAA CTC CAT AGC GGC	816
Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser Gly	
240 245 250	

CTT TTC CTC TAC CAG GGG CTC CTG CAG GCC CTG GAA GGG ATC TCC CCC	864
Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro	
255 260 265	
GAG TTG GGT CCC ACC TTG GAC ACA CTG CAG CTG GAC GTC GCC GAC TTT	912
Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe	
270 275 280	
GCC ACC ACC ATC TGG CAG CAG ATG GAA GAA CTG GGA ATG GCC CCT GCC	960
Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala	
285 290 295	
CTG CAG CCC ACC CAG GGT GCC ATG CCG GCC TTC GCC TCT GCT TTC CAG	1008
Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln	
300 305 310 315	
CGC CGG GCA GGA GGG GTC CTA GTT GCC TCC CAT CTG CAG AGC TTC CTG	1056
Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe Leu	
320 325 330	
GAG GTG TCG TAC CGC GTT CTA CGC CAC CTT GCC CAG CCC	1095
Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro	
335 340	

配列番号 : 7

配列の長さ : 44

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を示す記号 : sig peptide

存在位置 : 27..44

配列

CTCTCCAAGC TTGAATTCCG GCCAGAATGG AGCTGACTGA ATTG

44

配列番号 : 8

配列の長さ : 47

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を示す記号 : CDS

存在位置 : 23..47

配列

GTAGAGGTAC CGCGGCCGCT TACCCTTCCT GAGACAGATT CTGGGAG

47

配列番号 : 9

配列の長さ : 24

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を示す記号 : CDS

存在位置 : 1..24

配列

TGAACCTCTG GGCCTGGCT CAGT

24

配列番号 : 10

配列の長さ : 24

配列の型： 核酸

鎖の数： 一本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： 他の核酸 合成DNA

配列の特徴：

特徴を示す記号： CDS

存在位置： 1..24

配列

GCTGCCTGCT GTGGACTTTA GCTT

24

配列番号： 11

配列の長さ： 24

配列の型： 核酸

鎖の数： 一本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： 他の核酸 合成DNA

配列の特徴：

特徴を示す記号： CDS

存在位置： 1..24

配列

TGTTGGAAGC TCAGGAAGAT GGCA

24

配列番号： 12

配列の長さ： 24

配列の型： 核酸

鎖の数： 一本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： 他の核酸 合成DNA

配列の特徴：

特徴を示す記号：CDS

存在位置： 1..24

配列

CCTGATGCTT GTAGGAGGGT CCAC

24

配列番号：13

配列の長さ： 24

配列の型： 核酸

鎖の数： 一本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： 他の核酸 合成DNA

配列の特徴：

特徴を示す記号：CDS

存在位置： 1..24

配列

TCAAGAGTTC GTGTATCCTG TTCA

24

配列番号：14

配列の長さ： 24

配列の型： 核酸

鎖の数： 一本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： 他の核酸 合成DNA

配列の特徴：

特徴を示す記号：CDS

存在位置： 1..24

配列

GAATGGAAT CGTGGACTCT TTCC 24

配列番号 : 15

配列の長さ : 17

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

GTAAAACGAC GGCCAGT

17

配列番号 : 16

配列の長さ : 17

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

CAGGAAACAG CTATGAC

17

配列番号 : 17

配列の長さ : 13

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Arg

1

5

10

配列番号 : 18

配列の長さ： 66

配列の型： 核酸

鎖の数： 一本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： 他の核酸 合成DNA

配列の特徴：

特徴を示す記号： CDS

存在位置： 1..3

特徴を示す記号： CDS

存在位置： 43..66

配列

TGCTCTAGAA CCGCCTCCGG AACCACTCC AGAACCGCCA CCCCTGACGC AGAGGGTGGG 60
CCCTCC 66

配列番号： 19

配列の長さ： 45

配列の型： 核酸

鎖の数： 一本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： 他の核酸 合成DNA

配列の特徴：

特徴を示す記号： CDS

存在位置： 22..45

配列

GGTTCCGGAG GCGGTTCTAG AGCACCAACA TATCGCGCCT CGAGT 45

配列番号： 20

配列の長さ： 48

配列の型： 核酸

鎖の数： 一本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： 他の核酸 合成DNA

配列の特徴：

特徴を示す記号：CDS

存在位置：28..48

配列

CATTCCGCGG GGTACCGCGG CCGCTCAGGG CTGGGCAAGG TGGCGTAG

48

配列番号：21

配列の長さ： 24

配列の型： 核酸

鎖の数： 一本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： 他の核酸 合成DNA

配列の特徴：

特徴を示す記号：CDS

存在位置：1..24

配列

GGCTGCTTGA GCCAACTCCA TAGC

24

配列番号：22

配列の長さ： 24

配列の型： 核酸

鎖の数： 一本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： 他の核酸 合成DNA

配列の特徴：

特徴を示す記号：CDS

存在位置：1..24

配列

GACCCAACTC GGGGGAGATC CCTT

24

配列番号：23

配列の長さ： 57

配列の型： 核酸

鎖の数： 一本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： 他の核酸 合成DNA

配列の特徴：

特徴を示す記号：CDS

存在位置：1..27

特徴を示す記号：CDS

存在位置：28..57

特徴を示す記号：mutation

存在位置：25

特徴を示す記号：mutation

存在位置：33..34

配列

TAGACTCGAG GCGCGATATG TTGGCGCCCG CCGTACGCAG AGGGTGGACC CTCCTAC

57

配列番号：24

配列の長さ： 17

配列の型： アミノ酸

鎖の数： 一本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： ペプチド

配列

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Arg
1 5 10 15

配列番号 : 25

配列の長さ : 61

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を示す記号 : CDS of TP0

存在位置 : 1..6

特徴を示す記号 : linker peptide

存在位置 : 7..57

特徴を示す記号 : CDS of ND28

存在位置 : 58..61

特徴を示す記号 : SphI

存在位置 : 1..5

特徴を示す記号 : MroI

存在位置 : 7..12

特徴を示す記号 : MroI

存在位置 : 43..48

特徴を示す記号 : BbeI

存在位置 : 58..61

特徴を示す記号 : mutation

存在位置 : 4..5

配列

GTACGGTCCG GAGGTGGCTC TGGCGGTGGT TCTGGTGGCG GCTCCGGAGG CGGTCGTGCG C 61

配列番号 : 26

配列の長さ : 53

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を示す記号 : CDS of TP0

存在位置 : 52..53

特徴を示す記号 : linker peptide

存在位置 : 1..51

特徴を示す記号 : SphI

存在位置 : 53

特徴を示す記号 : MroI

存在位置 : 10..15

特徴を示す記号 : MroI

存在位置 : 46..51

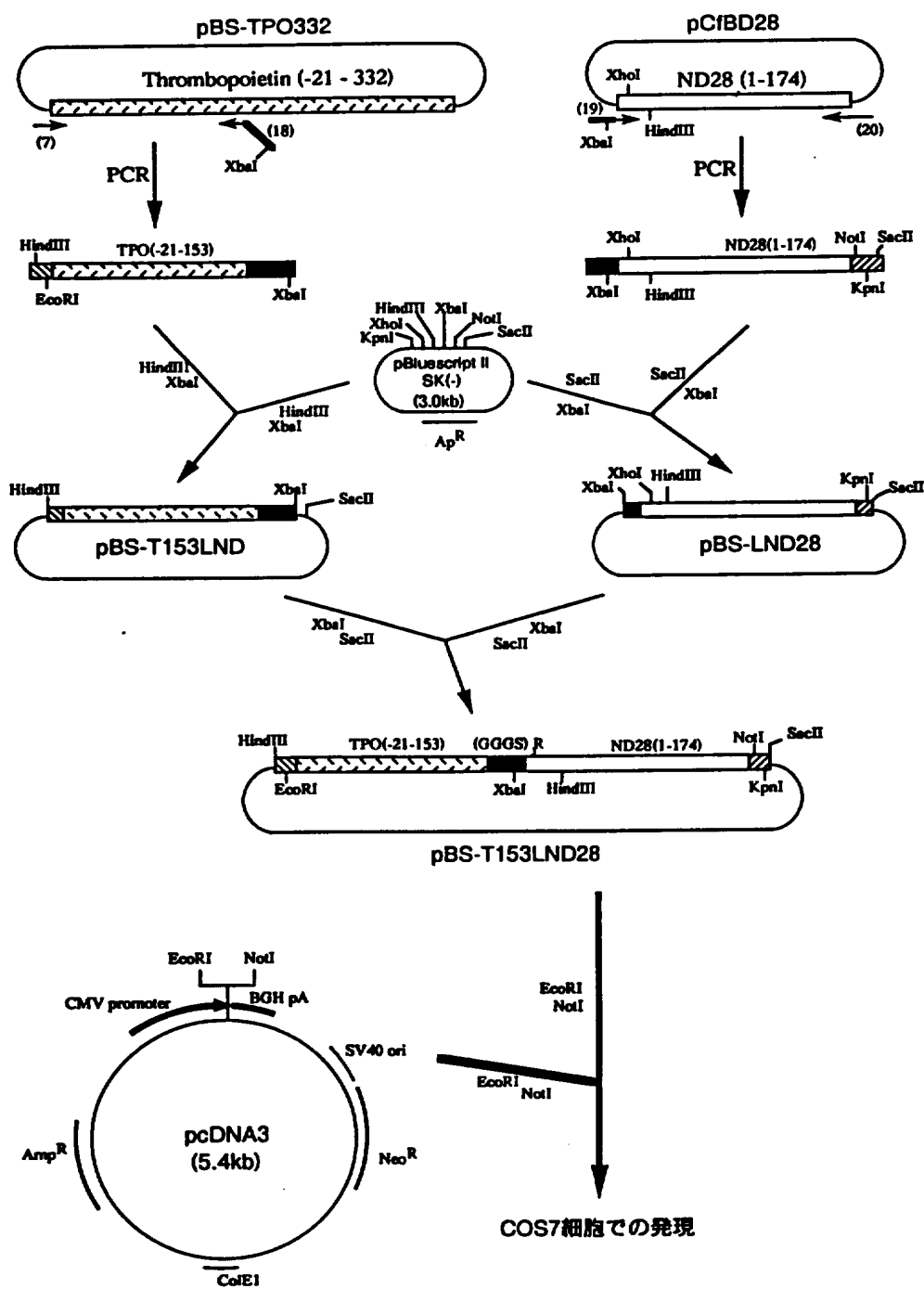
配列

ACGACCGCCT CCGGAGCCGC CACCAGAACC ACCGCCAGAG CCACCTCCGG ACC 53

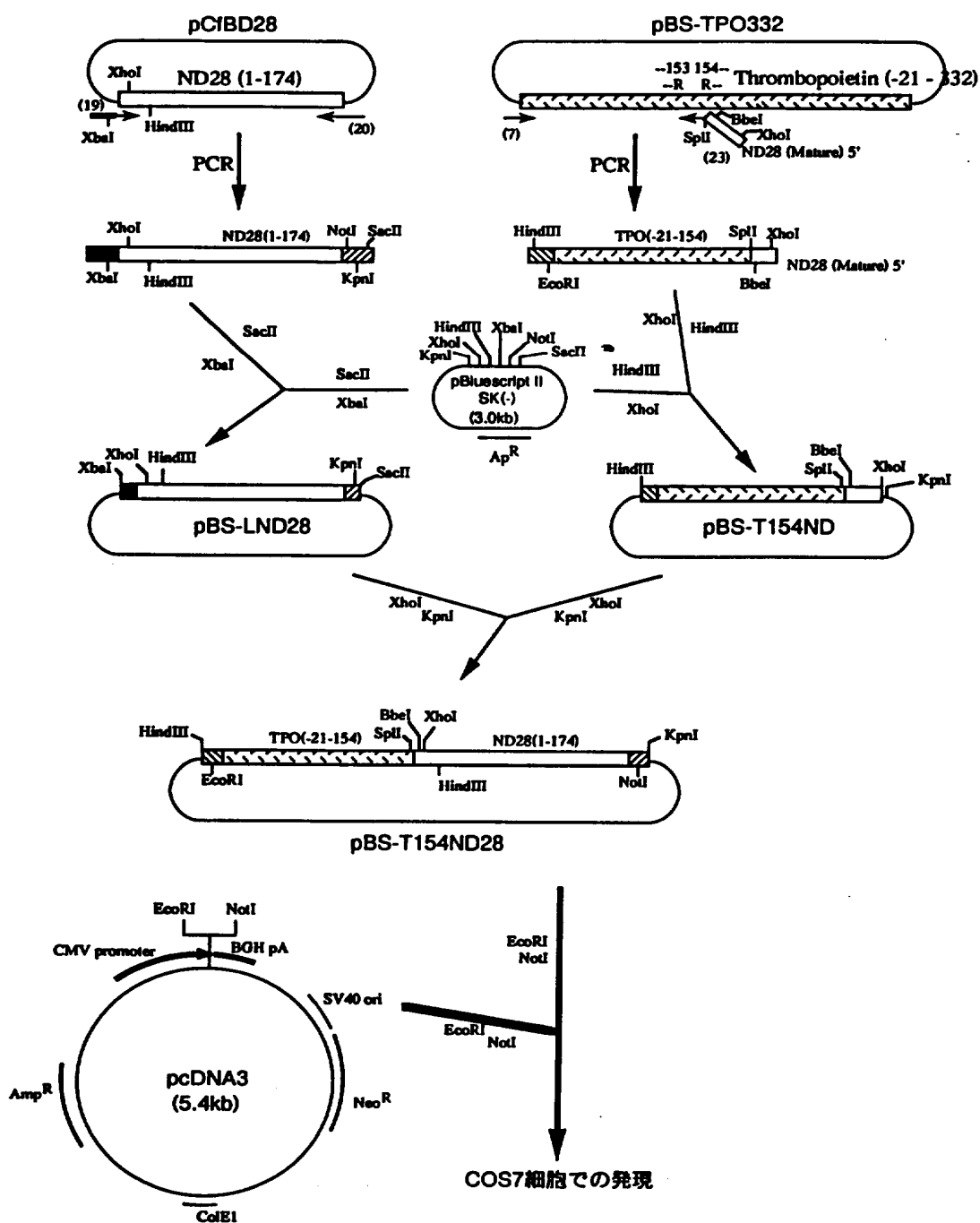
請 求 の 範 囲

1. ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチドと血小板増幅因子活性を有するポリペプチドとからなる融合ポリペプチド。
2. スペーサーペプチドを介して、ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチドと血小板増幅因子活性を有するポリペプチドとが融合した融合ポリペプチド。
3. 融合ポリペプチドが、配列番号 1、2、3、4、5 および 6 に示したアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含むポリペプチドである、請求項 1 記載の融合ポリペプチド。
4. 請求項 1、2、または 3 記載の融合ポリペプチドのアミノ酸配列において、1 個以上のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されており、かつヒト顆粒球コロニー刺激因子活性および血小板増幅因子活性を有する融合ポリペプチド。
5. 請求項 1、2、3、または 4 記載の融合ポリペプチドの少なくとも 1 個のアミノ基がポリアルキレングリコール誘導体で化学修飾されたヒト顆粒球コロニー刺激因子活性および血小板増幅因子活性を有する融合ポリペプチド。
6. ポリアルキレングリコール誘導体が、ポリエチレングリコール誘導体、ポリプロピレングリコール誘導体、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体の誘導体である、請求項 5 記載の融合ポリペプチド。
7. 請求項 1、2、3、または 4 記載の融合ポリペプチドをコードする DNA。
。
8. DNA が、配列番号 4、5 および 6 に示した DNA 配列から選ばれる配列を含む DNA である、請求項 6 記載の DNA。
9. 請求項 1、2、3、4 または 5 記載の融合ポリペプチドを有効成分として含有してなる貧血治療剤。

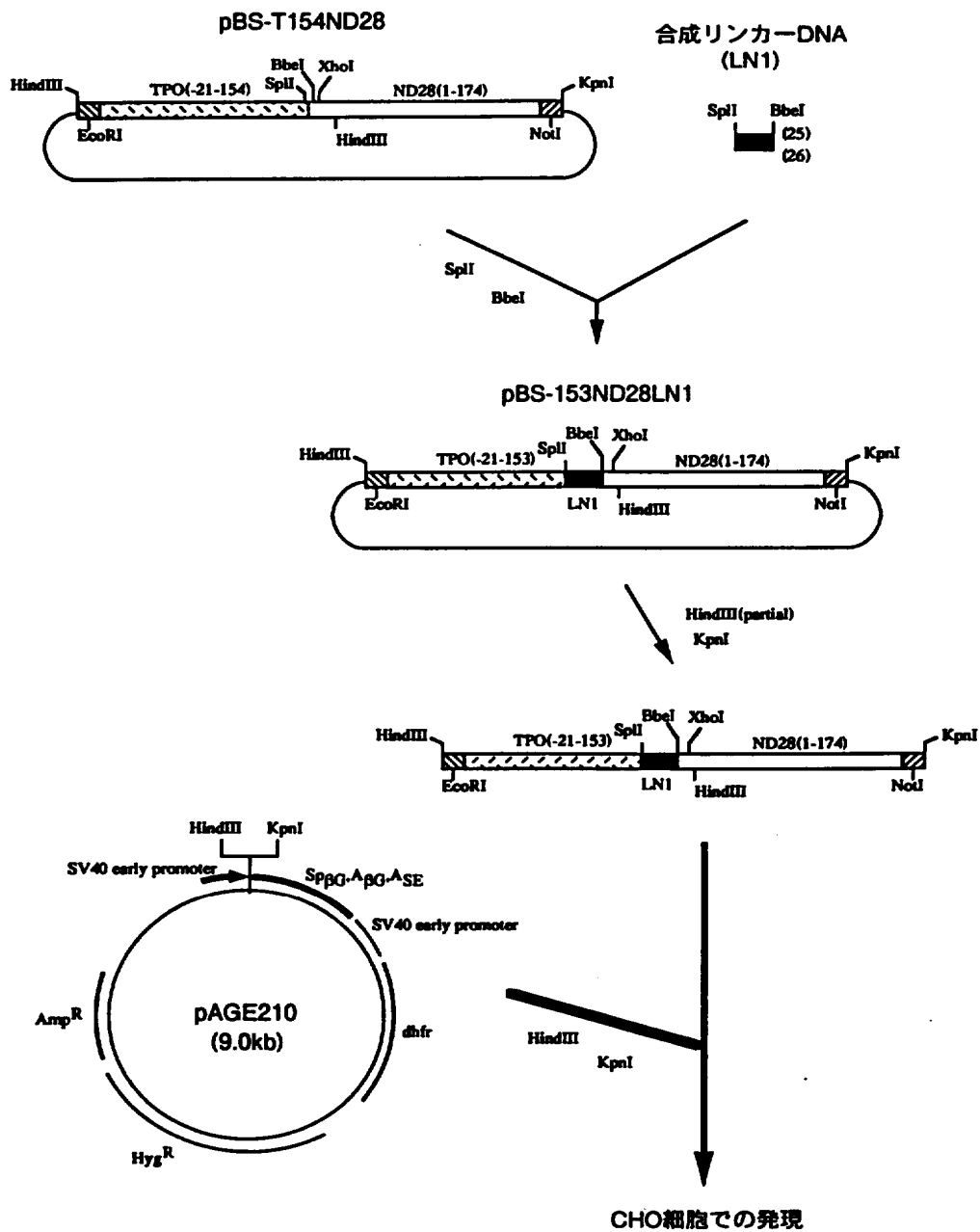
第 1 図



第 2 図



第 3 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/01157

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C07K19/00, C07K14/535, C07K14/52, C12N15/62, A61K38/19 //
C12P21/02, C12N5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C07K19/00, C07K14/535, C07K14/52, C12N15/62, A61K38/19 //
C12P21/02, C12N5/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, WPI, WPI/L

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP, 4-103599, A (Toray Industries, Inc.), April 6, 1992 (06. 04. 92) (Family: none)	1-2, 4, 7, 9 3, 5-6, 8
X Y	JP, 5-502463, A (Ortho Pharmaceutical Corp.), April 28, 1993 (28. 04. 93) & WO, 9206116, A & AU, 9187359, A & EP, 544292, A & PT, 99107, A & ZA, 9107766, A & AU, 9511576, A	1-2, 4, 7, 9 3, 5-6, 8
X Y	JP, 6-500116, A (Genetics Institute, Inc.), January 6, 1994 (06. 01. 94) & WO, 9204455, A & AU, 9189174, A & EP, 546124, A & AU, 651152, B	1-2, 4, 7, 9 3, 5-6, 8
Y	JP, 1-316400, A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), December 21, 1989 (21. 12. 89) & EP, 335423, A & AU, 8932341, A & AU, 9217032, A & US, 5194592, A & US, 5214132, A & AU, 640567, B & US, 5362853, A	1 - 9



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

June 5, 1996 (05. 06. 96)

Date of mailing of the international search report

June 18, 1996 (18. 06. 96)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/01157

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	de Sauvage, F.J. et al. "Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand", Nature (1994) Vol. 369, p. 533-538	1 - 9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C07K 19/00, C07K 14/535, C07K 14/52, C12N 15/62, A61K 38/19 // C12P 21/02, C12N 5/10

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C07K 19/00, C07K 14/535, C07K 14/52, C12N 15/62, A61K 38/19 // C12P 21/02, C12N 5/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, WPI, WPI/L

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP, 4-103599, A (東レ株式会社) 6.4月.1992 (06.04.92) ファミリーなし	1-2, 4, 7, 9 3, 5-6, 8
X Y	JP, 5-502463, A (オソ・ファーマシューチカル・コーポレーション) 28.4月.1993 (28.04.93) & WO, 9206116, A & AU, 9187359, A & EP, 544292, A & PT, 99107, A & ZA, 9107766, A & AU, 9511576, A	1-2, 4, 7, 9 3, 5-6, 8
X Y	JP, 6-500116, A (ジェネティクス・インスティテュート・インコーポレイテッド) 6.1月.1994 (06.01.94) & WO, 9204455, A & AU, 9189174, A & EP, 546124, A & AU, 651152, B	1-2, 4, 7, 9 3, 5-6, 8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05.06.96

国際調査報告の発送日

18.06.96

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

4 B

9281

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 1-316400, A (協和醗酵工業株式会社) 21. 12月. 1989 (21. 12. 89) & EP, 335423, A & AU, 8932341, A & AU, 9217032, A & US, 5194592, A & US, 5214132, A & AU, 640567, B & US, 5362853, A	1-9
Y	de Sauvage, F. J. et al. "Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombo- poiesis by the c-Mpl ligand", Nature (1994) 第369巻, p. 533-538	1-9